

FARAH DIBA HALFPAP DALSENER

**EFEITO DA TEMPERATURA NA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *Rhizopus*
oryzae EM CULTIVO NO ESTADO SÓLIDO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências – Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. David Alexander Mitchell

Co-orientador: Prof^a. Dr. Nadia Krieger

CURITIBA

2005

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer ao Professor David, pela sua orientação sem igual, sua paciência, todos os seus ensinamentos, sua dedicação e incondicional disponibilidade.

À professora Nádia, por sua co-orientação e valiosas sugestões.

A minha querida amiga, Professora Márcia Brandão Palma, por toda ajuda disponibilizada em todos os momentos durante a realização deste trabalho.

À Karen, um especial agradecimento por estar sempre presente e pronta a ajudar em todos os momentos de mais esta etapa na minha vida.

Ao meu amigo André Luís, pela importância da sua amizade durante esta jornada.

À coordenação e aos professores do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica pela oportunidade e por todos os ensinamentos.

Ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Regional de Blumenau, mais precisamente aos Professores Laércio, Lorena e Márcia pelo apoio e pela disponibilização de laboratório e equipamentos utilizados nesta pesquisa.

A todos os meus amigos de curso, principalmente ao Ricardo, Rodrigo, Graciele, Valéria, Ana Cláudia, Ricardo W., Karen e Luísa.

Ao Afonso, meu querido e amado companheiro, por todo seu amor, paciência e incondicional ajuda nesta etapa de nossas vidas.

A minha irmã Sabrina e minha mãe Silvia (*in memoriam*) simplesmente por tudo.

À Universidade Federal do Paraná, CAPES, Fundação Araucária, CBAB e CNPQ pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	ii
SUMÁRIO	iii
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	ix
NOMENCLATURA.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO – FES.....	3
2.1.1 Definição e Histórico	3
2.1.2 Aplicações da FES.....	4
2.1.3 Características da FES	6
2.1.4 Sistema <i>Overculture</i>	20
2.1.5 A Importância da Modelagem Matemática em FES	23
2.1.6 Fenômenos que Influenciam o Comportamento de um Biorreator.....	24
2.1.8 Os Modelos Cinéticos	29
2.1.9. Avaliação do Estado da Literatura	36
3 OBJETIVOS.....	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 MICRORGANISMO UTILIZADO.....	39
4.2 CONSERVAÇÃO DA CEPA	39
4.3 OBTENÇÃO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS.....	40
4.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ESPOROS DA SUSPENSÃO.....	41
4.5 SELEÇÃO DO MEIO DE CULTIVO A SER UTILIZADO NOS EXPERIMENTOS COM <i>Rhizopus oryzae</i>	43

4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO ÓTIMA DO TAMPÃO FOSFATO	44
4.7 ESTUDO DO CRESCIMENTO RADIAL DE <i>R. oryzae</i> EM DIFERENTES TEMPERATURAS	45
4.8 ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA SOBRE O CRESCIMENTO DE <i>R. oryzae</i> EM <i>OVERCULTURE</i> - CONDIÇÕES ISOTÉRMICAS.....	45
4.9 DETERMINAÇÃO DA MASSA SECA DO MICÉLIO.....	46
4.10 ESTUDO DA VARIAÇÃO DA TEMPERATURA SOBRE O CRESCIMENTO DE <i>R. oryzae</i> em <i>overculture</i> – CONDIÇÕES NÃO ISOTÉRMICAS.....	47
4.11 SELEÇÃO DO MEIO DE CULTIVO A SER UTILIZADO DURANTE OS EXPERIMENTOS CONDUZIDOS EM BIORREADORES DE COLUNA.....	48
4.11.1 Preparo dos Meios para o Cultivo em Estado Sólido	48
4.12 CONDIÇÕES DE CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO EM BIORREADORES DE COLUNA.....	49
4.12.1 Sistema de Biorreatores de Colunas.....	49
4.12.2 Condições de Cultivo nos Biorreatores de Coluna.....	52
4.12.3 Tratamento das Amostras	53
4.13 EFEITO DA VARIAÇÃO DA TEMPERATURA SOBRE A VELOCIDADE DE CONSUMO DE OXIGÊNIO DE <i>Rhizopus oryzae</i> EM CONDIÇÕES NÃO ISOTÉRMICAS	54
4.14 MÉTODOS ANALÍTICOS	55
4.14.1 Extração da Enzima Glucoamilase do Meio.....	55
4.14.2 Determinação da Atividade da Glucoamilase (E.C. 3.2.1.3. 1,4- α -D-Glican-glicohidrolase).....	55
4.14.3 Método da Glucose-Oxidase Para a Dosagem da Glucose	56
4.14.4 Determinação do Conteúdo de Glucosamina.....	57
4.14.5 Correlação Entre Biomassa e Conteúdo de Glucosamina em Sistema <i>Overculture</i>	58
4.14.6 Determinação do Consumo de Oxigênio.....	58
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1 ESTUDOS PRELIMINARES.....	62
5.1.1 Seleção do Meio de Cultivo.....	63
5.1.2 Determinação da Concentração de Tampão Fosfato.....	64
5.1.3 Influência da Temperatura no Crescimento Radial	64

5.1.4 Influência da Temperatura Sobre o Crescimento de <i>R. oryzae</i> em Sistema Overculture.....	65
5.2 CULTIVO EM BIORREADORES DE COLUNA.....	70
5.2.1 Seleção do Meio de Cultivo.....	71
5.2.2 DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA NOS CULTIVOS EM BIORREADORES DE COLUNA	75
5.2.3 Efeito da Variação da Temperatura no Cultivo de <i>Rhizopus oryzae</i> em Condições Não-Isotérmicas Monitorado pelo Consumo de O ₂	78
5.3 COMPORTAMENTO CINÉTICO DE <i>Rhizopus oryzae</i> EM SISTEMA OVERCULTURE.....	82
5.3.1 Avaliação do Comportamento Cinético de <i>R. oryzae</i> em Sistema Overculture em Abordagem Isotérmica.....	82
5.3.2 Avaliação do Comportamento Cinético de <i>R. oryzae</i> em Sistema Overculture em Abordagem Não Isotérmica	83
5.4 MODELO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE <i>R. oryzae</i> EM CULTIVO SOBRE PLACAS	93
5.4.1 Desenvolvimento do Modelo	94
5.4.2 Apresentação dos Parâmetros	99
5.4.3 Aplicação dos Modelos 1 e 2 para os Dados de Biomassa Provenientes de Cultivos Não Isotérmicos.....	100
5.4.4 Importância da Abordagem Utilizada no Presente Trabalho	105
5.4.5 Conclusões Do Modelo	107
6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	108
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1	Fluxograma para validação de um componente celular como indicador indireto do crescimento.....	17
FIGURA 2.2	Fases do desenvolvimento do fungo cultivado em sistema <i>overculture</i>	21
FIGURA 2.3	Fenômenos de micro e macroescala que ocorrem no interior de um biorreator.....	27
FIGURA 2.4	“Aproximação Isotérmica”.....	34
FIGURA 4.1	Esquema de preparo da suspensão de esporos de <i>Rhizopus oryzae</i>	41
FIGURA 4.2	Esquema da câmara de Neubauer 1/400 mm ² com destaque para o reticulado central.....	42
FIGURA 4.3	Direção da leitura do crescimento radial de <i>R. oryzae</i> a partir do ponto de inoculação.....	44
FIGURA 4.4	Estratégia de incubação utilizada nos experimentos não isotérmicos.....	47
FIGURA 4.5	Ilustração de uma coluna preenchida com farelo de trigo encaixada no umidificador secundário.....	49
FIGURA 4.6	Umidificador primário utilizado para a distribuição de ar.....	50
FIGURA 4.7	Fluxômetros utilizados para o controle da vazão de ar nas colunas.....	51
FIGURA 4.8	Disposição dos fluxômetros no sistema.....	51
FIGURA 4.9	Banho termostático com circulação utilizado para controle da temperatura do sistema.....	52
FIGURA 4.10	Esquema das determinações analíticas do meio fermentado	54
FIGURA 4.11	Equipamentos utilizados na determinação do consumo de oxigênio.....	59
FIGURA 5.1	Perfil da influência da temperatura sobre o crescimento radial do fungo.....	65
FIGURA 5.2	Perfil dos dados de biomassa seca em função do tempo ajustados à equação Logística.....	67

FIGURA 5.3	Oxigênio consumido em função do tempo de medida.....	72
FIGURA 5.4	Padrões cinéticos da MrO durante FES dos 3 meios testados.....	74
FIGURA 5.5	Evolução do conteúdo de glucosamina ao longo do tempo de cultivo de <i>R. oryzae</i>	76
FIGURA 5.6	Perfil da concentração de glucosamina nas amostras provenientes do cultivo de <i>R. oryzae</i> em biorreatores de coluna.....	77
FIGURA 5.7	Perfil da velocidade de consumo de oxigênio e da atividade em glucoamilase de <i>R. oryzae</i> cultivado isotermicamente a 34 °C.....	79
FIGURA 5.8	Perfil da velocidade de consumo de oxigênio de <i>R. oryzae</i> em cultivo isotérmico e não isotérmico.....	80
FIGURA 5.9	Efeito do aumento da temperatura sobre a produção de glucoamilase.....	81
FIGURA 5.10	Perfil cinético de <i>R. oryzae</i> em cultivo isotérmico em 4 temperaturas diferentes.....	83
FIGURA 5.11	Perfil da biomassa seca de <i>R. oryzae</i> em vários regimes de incubação com aumento de temperatura para 45 °C.....	84
FIGURA 5.12	Perfil da biomassa seca de <i>R. oryzae</i> em vários regimes de incubação com aumento de temperatura para 40 °C.....	85
FIGURA 5.13	Adaptação da proposta de possíveis respostas do fungo às mudanças na temperatura de incubação.....	90
FIGURA 5.14	Perfil do ajuste da equação Logística aos dados de biomassa seca em função do tempo de cultivo isotérmico.....	94
FIGURA 5.15	Representação esquemática do modelo cinético.....	95
FIGURA 5.16	Ajuste do Modelo 1 aos dados experimentais do perfil de crescimento de <i>R. oryzae</i> .com aumento de temperatura para 45 °C.....	101
FIGURA 5.17	Ajuste do Modelo 1 aos dados experimentais do perfil de crescimento de <i>R. oryzae</i> .com aumento de temperatura para 40 °C.....	101
FIGURA 5.18	Ajuste do Modelo 2 aos dados experimentais do perfil de crescimento de <i>R. oryzae</i> .com aumento de temperatura para	

45 °C.....	103
FIGURA 5.19 Ajuste do Modelo 2 aos dados experimentais do perfil de crescimento de <i>R. oryzae</i> .com aumento de temperatura para 40 °C.....	103

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1	Aplicações da FES.....	5
TABELA 2.2	Formas diferenciadas e integrais das várias equações de crescimento empíricas aplicadas em sistemas de FES.....	30
TABELA 4.1	Composição dos meios de cultivo.....	43
TABELA 5.1	Composição dos meios testados e avaliação qualitativa do crescimento.....	63
TABELA 5.2	Diferentes concentrações de tampão fosfato testados no meio 6.....	64
TABELA 5.3	Valores de μ e X_M estimados para cada temperatura pelo ajuste da equação Logística aos dados experimentais.....	66
TABELA 5.4	Faixa de temperatura utilizada para o cultivo de fungos do gênero <i>Rhizopus</i>	69
TABELA 5.5	Ajuste dos valores de consumo de oxigênio com o tempo de medida.....	73
TABELA 5.6	Velocidade máxima de consumo de oxigênio alcançada nos diferentes meios testados.....	74
TABELA 5.7	Resumo dos efeitos do aumento da temperatura provenientes de cultivos não isotérmicos em sistema <i>overculture</i>	87
TABELA 5.8	Valores estimados para os parâmetros utilizados nos Modelos 1 e 2.....	100

NOMENCLATURA

FES	fermentação no estado sólido
FSm	fermentação submersa
a_w	atividade de água
<i>Overculture</i>	método de cultivo de microrganismos que consiste no crescimento de múltiplas colônias após o espalhamento de uma suspensão concentrada de esporos sobre uma superfície sólida
ATCC	American Type Culture Collection
BDA	batata dextrose agar
E.L.	extrato de levedura
max	máximo
M.OUR	velocidade de consumo de oxigênio em função da massa de meio sólido fermentado (mmol O ₂ /min)
OUR	velocidade de consumo de oxigênio (mmol.g/min)
CER	velocidade de produção de CO ₂ (mmol.g/min)
X	quantidade de biomassa (g.cm ⁻²)
X ₀	quantidade inicial de biomassa (g.cm ⁻²)
X _{max}	quantidade máxima de biomassa possível (g.cm ⁻²)
X*	biomassa injuriada – biomassa marcada para desaparecer (g.cm ⁻²)
B	biomassa acumulativa (g.cm ⁻²) – soma da biomassa atual com aquela que já existiu e não existe mais
μ	constante da velocidade específica de crescimento (h ⁻¹)
F	componente essencial intracelular inespecífico
n	expoente que caracteriza a versão <i>power law</i> da equação Logística
K _S	coeficiente da reação de síntese do componente essencial F (h ⁻¹)
k _D	coeficiente da reação de desnaturação do componente essencial F (h ⁻¹)
A _S	fator de frequência para a reação de síntese do componente essencial F (h ⁻¹)
A _D	fator de frequência para a reação de desnaturação do componente essencial F (h ⁻¹)
E _S	energia de ativação para a reação de síntese do componente essencial F (J.mol ⁻¹)

E_D	energia de ativação para a reação de desnaturação do componente essencial F (J.mol^{-1})
k_{DX}	constante de desaparecimento de biomassa seca (h^{-1})
A_{DX}	fator de frequência para a reação de desaparecimento da biomassa seca (h^{-1})
E_{DX}	energia de ativação para a reação de desaparecimento da biomassa seca (J.mol^{-1})
k_{DX1}	constante da velocidade de reação de conversão de biomassa viva em biomassa marcada para desaparecer (h^{-1})
k_{DX2}	constante da velocidade de reação de desaparecimento de biomassa (h^{-1})
R	constante universal do gases ($\text{J mol}^{-1} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$)
T	Temperatura ($^\circ\text{C}$)
P_{O2i}	pressão parcial do oxigênio inicial (mmHg)
P_{O2t}	pressão parcial do oxigênio, após o tempo de medida (mmHg)
P_t	pressão parcial no ambiente (mmHg)
P_{vH2O}	pressão de vapor da água (mmHg)
V	volume (L)

RESUMO

A cinética de crescimento do fungo *Rhizopus oryzae* foi avaliada em condições não isotérmicas em fermentação no estado sólido quando cultivado em biorreatores de coluna e quando cultivado em sistema *overculture*. O estudo foi executado em 4 grandes etapas: na primeira foram selecionados os meios ideais para cada tipo de cultivo e a temperatura ótima para incubação. Nas segunda e terceira etapas avaliou-se o crescimento do fungo em condições não isotérmicas, seguindo a velocidade de consumo de oxigênio e a produção da enzima glucoamilase quando o cultivo foi realizado em biorreatores de coluna; e medindo diretamente a massa seca de micélio quando o cultivo foi realizado em sistema *overculture*. Quando cultivado em *overculture*, as elevações de temperatura, partindo da ótima de 34 °C, para 40 °C ou 45 °C, foram impostas em três tempos diferentes de cultivo: em 15, 18 e 24 horas. Na quarta etapa, com os resultados da medição direta da massa seca do micélio, desenvolveu-se um modelo matemático cinético empírico que postula que o crescimento é controlado pelo nível de um componente intracelular essencial denominado de “F” que também é responsável pela sua própria síntese e sofre desnaturação térmica. Isto é, o nível deste componente “F” representa o estado fisiológico da célula. Quando exposto a 45 °C durante um período de 6 h, o crescimento do fungo em sistema *overculture* foi fortemente afetado, não recuperando sua velocidade de crescimento normal quando a temperatura retornou para 34 °C. O mesmo ocorreu com a velocidade de consumo de oxigênio e com a produção da glucoamilase nos biorreatores de coluna. Quando a temperatura foi elevada para 40 °C, os efeitos foram mais amenos, mas não houve recuperação da produção da enzima quando a temperatura retornou para 34 °C, nem recuperação da velocidade de consumo de oxigênio, e tampouco da velocidade de crescimento nos cultivos em *overculture*. Uma observação importante foi que o surgimento dos efeitos negativos da alta temperatura, refletidos na velocidade de crescimento dependeu do tempo de cultivo em que os aumentos de temperatura foram impostos. O modelo matemático gerado para a cinética de crescimento se ajustou razoavelmente bem aos dados experimentais com um único conjunto de parâmetros e sua natureza empírica o torna simples e apto para ser incorporado dentro um modelo de biorreator de cultivo no estado sólido.

ABSTRACT

The kinetics of growth of the fungus *Rhizopus oryzae* in solid-state fermentation were evaluated in non-isothermal conditions, both in an overculture system and in column bioreactors. The study was undertaken in four main parts. The first part involved the selection of media and culture conditions for the two culture systems and determination of the optimum temperature of growth. The second part involved the cultivation of the fungus in non-isothermal conditions, with measurement of the oxygen uptake rate and production of glucoamylase in the column bioreactors. The third part involved the and direct measurement of the dry biomass in the overculture system. In this system cultures were initially incubated at the optimum growth temperature of 34 °C and then exposed to either 40 °C or 45 °C for a period of 6 h during the growth cycle, before returning to 34 °C. In three different treatments cultures were exposed to the high temperature 15, 18 and 24 h after inoculation. The fourth part involved the development of an empirical mathematical model to describe the overculture results. This model postulates that growth is controlled by the level of an intracellular “essential component”, denominated F, which also plays a role in its own synthesis and suffers thermal denaturation. That is, the level of the component F represents the physiological state of the biomass. The growth of the fungus in the overculture system was strongly affected by exposure to 45 °C: the dry biomass decreased during the exposure and the fungus was unable to recuperate its normal growth rate when returned to 34 °C. Similar effects were noted with respect to oxygen consumption rates and glucoamylase production in the column bioreactors. Most notably, glucoamylase production ceased when the culture was exposed to 45 °C and did not recover when it was returned to 34 °C. When the temperature was elevated to 40 °C, the effects were less drastic, with only a very slight loss of dry biomass in overculture. However, in column bioreactors glucoamylase production did not restart when the culture was returned to 34 °C, nor did the oxygen uptake rate return to normal values. An important observation was that the magnitude of the negative effects of high temperature depended on the time after inoculation at which the exposure was imposed. The mathematical model that was developed was able to describe the experimental growth profiles reasonably, using a single set of parameters. It is sufficiently simple to be suitable for incorporation into mathematical models of solid-state fermentation bioreactors.

1 INTRODUÇÃO

Esta tese trata do estudo da cinética de crescimento de fungos filamentosos dentro do ambiente proporcionado pelo sistema de cultivo no estado sólido (FES), enfocando os efeitos da variação da temperatura. A FES é estritamente referida ao crescimento de microrganismos sobre substratos sólidos na ausência de água livre nos espaços entre as partículas (HESSELTINE 1972, 1977; CANNEL & MOO-YOUNG, 1980), sendo que o termo FES não pode ser aplicado às fermentações sobre materiais suspensos na fase líquida (DURAND & CHEREAU, 1988).

A temperatura é um dos fatores ambientais da maior importância para o crescimento fúngico em sistemas de FES devido às limitações na dissipação de calor e na transferência de massa. Esta limitação do sistema, causada por características próprias do meio sólido como a sua baixa condutividade térmica, dificulta a remoção do calor e conduz ao aumento da temperatura no leito.

Os efeitos deletérios da alta temperatura sobre a cinética de crescimento e sobre a fisiologia do microrganismo tornam desejável o controle da temperatura em FES. Entretanto, devido às dificuldades na remoção do calor, os microrganismos cultivados em biorreatores de FES de grande escala são comumente expostos a temperaturas altas. Entretanto, embora os efeitos deletérios sejam reconhecidos, poucas informações específicas estão disponíveis na literatura sobre a influência dos aumentos de temperatura na cinética de crescimento de fungos filamentosos.

O biorreator, equipamento utilizado para o cultivo de microrganismos e a respectiva produção de metabólitos, tem o objetivo de manter o ambiente de cultivo em condições ideais para o crescimento e formação de produtos, sendo que muitos tipos de biorreatores podem ser utilizados em FES. Em escala laboratorial é possível utilizar diferentes equipamentos como biorreatores de bandeja, de colunas ou mesmo de cilindro rotatório sem levar em consideração as variáveis ambientais como a temperatura. Porém, para a operação dos biorreatores de escala comercial, variáveis ambientais devem ser consideradas, uma vez que quanto maior o tamanho do biorreator, maiores são os problemas enfrentados para manter o ambiente de cultivo em condições ideais.

Para a comercialização das aplicações da FES, é preciso desenvolver estratégias de aumento de escala para o projeto de biorreatores de grande escala. A

modelagem matemática é uma ferramenta útil para a otimização da operação de biorreatores e também para o seu aumento de escala. Esta ferramenta fornece informação quantitativa sobre a produção e a produtividade de biomassa e metabólitos e como esta produção é influenciada pelo modo em que o biorreator está sendo operado.

Os modelos atuais dos biorreatores de FES descrevem as cinéticas de crescimento dentro de uma abordagem pouco apropriada para um sistema de FES, ou seja, não levando em consideração as variações temporais da temperatura a que o fungo é exposto quando cultivado neste sistema. Portanto, é essencial desenvolver modelos matemáticos cinéticos que descrevam o comportamento do fungo mediante as variações de temperatura que tipicamente ocorrem durante o processo. Porém, para que tais modelos possam ser aplicados dentro de um modelo de um biorreator, eles devem ser simples. Podem ser empíricos, mas devem descrever bem o comportamento do microrganismo mediante as variações de temperatura.

Dentro deste contexto, o presente estudo visa conhecer a cinética de crescimento de fungos filamentosos em sistema de FES e o desenvolvimento de equações que descrevam o crescimento destes microrganismos frente a variações na temperatura, em modelos apropriados para serem incorporados em modelos de desempenho de biorreatores de FES.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO – FES

2.1.1 Definição e Histórico

A fermentação no estado sólido (FES) é um processo que se refere ao cultivo de microrganismos sobre partículas sólidas úmidas na ausência de água livre visível, sendo os espaços entre as partículas preenchidos com ar (MOO-YOUNG, MOREIRA & TENDERDY, 1983).

Os meios de cultivo utilizados em FES, na sua maioria, são produtos agrícolas ou sub-produtos de agroindústrias tais como o farelo de arroz (PALMA, 2003), farelo de trigo (NANDAKUMAR *et al.*, 1999), bagaço de mandioca (STERTZ *et al.*, 1999; DALSETER, 2000), torta de babaçu (PALMA *et al.*, 2000), bagaço de cana-de-açúcar (SOCCOL *et al.*, 1994) e farinha de trigo (NAGEL *et al.*, 2001). Estes substratos contêm, geralmente, substâncias macromoleculares como fonte de nutrientes e as enzimas hidrolíticas, secretadas pelo microrganismo, hidrolisam estas macromoléculas e liberam, assim, pequenas moléculas solúveis que podem ser utilizadas para o crescimento.

A técnica da FES tem sido utilizada desde os tempos em que o homem, apesar de fazer uso dos microrganismos para seu benefício, não compreendia os fenômenos fisiológicos e bioquímicos envolvidos nas transformações. Existem relatos desde o ano 1000 A.C., na China, onde se tem notícia da produção do molho de soja. Em 500 A.C. os chineses também produziam o “Chiang”, um alimento tipo “miso”, produzido por FES (HESSELTINE, 1977; CANNEL & MOO-YOUNG, 1980). Hoje, as fermentações de alimentos no Oriente são chamadas de “alimentos fermentados tradicionais” e incluem a fermentação do “shoyu” (molho de soja) e do “miso” (pasta de grãos de soja), e as grandes indústrias do gênero foram desenvolvidas a partir destes processos tradicionais (HESSELTINE & WANG, 1967; CANNEL & MOO-YOUNG, 1980; RAMANA MURTHY, KARANTH & RAO, 1993).

Por outro lado, nos países ocidentais e europeus, a FES foi negligenciada a partir de 1940 devido ao advento da tecnologia da fermentação submersa (FSm)

(LONSANE *et al.*, 1991; PANDEY, 2003). Após a segunda guerra mundial os processos de FSm tornaram-se muito conhecidos, impulsionados pelo sucesso na fabricação da penicilina, tornando o processo de FSm uma tecnologia modelo para a produção de qualquer composto por fermentação (PALMA, 2003; PANDEY, 2003).

Porém, foi o enriquecimento protéico de rações animais a principal atividade que motivou a utilização da FES após 1940 nos países ocidentais, envolvendo o uso de resíduos agroindustriais, agregando valor a um material de baixo custo e minimizando, de alguma maneira, a poluição causada por estes resíduos (PANDEY, 2003). Este último detalhe, típico de uma FES, desperta interesse mundial, o que impulsiona um contínuo avanço nos estudos referentes a este processo.

2.1.2 Aplicações da FES

A FES desenvolveu-se a partir da produção de alimentos tradicionais fermentados. Atualmente, sua aplicação é estendida às indústrias farmacêuticas e biotecnológicas (PALMA, 2003).

A aplicação comercial da FES pode ser dividida em dois tipos: 1) aplicações sócio-econômicas como a compostagem de resíduos e aproveitamento de resíduos agroindustriais; 2) aplicações economicamente lucrativas como a produção de enzimas e ácidos orgânicos (RAMANA-MURTHY *et al.*, 1993). Porém, há aplicações que aproveitam resíduos e visam a produção de produtos rentáveis (DALSETER, 2000; PALMA, 2003).

No âmbito da aplicação econômica, existe interesse em utilizar a FES para produzir uma variedade de enzimas, principalmente aquelas de origem fúngica, como mostra o crescente número de pesquisas executadas nesta área (PANDEY *et al.*, 1999).

Na Ásia, a FES é utilizada em escala industrial para produzir enzimas tais como amilases e proteases para a hidrólise do amido e das proteínas vegetais durante a produção de alimentos tais como o molho de soja, o tempe, o miso e o saquê (NAGEL *et al.*, 2002). Porém, sua aplicação nos países ocidentais ainda é incomum devido à falta de informações sobre o mecanismo que determina o

comportamento microbiano durante um processo de FES e também à falta de estratégias bem estabelecidas para o aumento de escala do processo.

A Tabela 2.1 mostra alguns exemplos de estudos onde o processo de FES foi aplicado.

TABELA 2.1 - APLICAÇÕES DA FES

Produto	Microrganismo	Referência
Ácido Giberélico	<i>Gibberella fujikuroi</i>	KUMAR & LONSANE, 1983
Amilases e Proteases	<i>Aspergillus niger</i> var. <i>brunneus</i>	NARAHARA <i>et al.</i> , 1982
Invertase	<i>Aspergillus niger</i>	MONTIEL-GONZÁLEZ <i>et al.</i> , 2003
Lacase	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	SOUZA, ZILLY & PERALTA, 2002
Xilanases	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	SOUZA, ROBERTO & MILAGRES, 1999. PALMA, 2003 LU, LI & WU, 2003
Glucoamilase e Xilanase	<i>Aspergillus niger</i> var. <i>awamori</i>	DALSENTER, 2000
Penicilina	<i>Penicillium crysogenum</i>	DOMINGUEZ, MEJIA & BARRIOS-GONZALEZ, 2000
Lipase	<i>Penicillium restrictum</i>	PALMA <i>et al.</i> , 2000
Aromas	<i>Ceratocystis fimbriata</i>	BRAMORSKI <i>et al.</i> , 1998 (b)
Alfa amilase	<i>Aspergillus niger</i>	RAMACHANDRAN <i>et al.</i> , 2004

Pectinases	<i>Aspergillus niger</i>	CASTILHO, MEDRONHO & ALVES, 2000
Endoglucanase	<i>Aspergillus niger</i>	JECU, 2000
Quitosana	<i>Gongronella butleri</i>	NWE <i>et al.</i> , 2001

2.1.3 Características da FES

A característica própria da FES é sua capacidade de proporcionar um ambiente seletivo com baixa umidade e apropriado para um organismo micelial que produz uma variedade de enzimas extracelulares e pode crescer em altas concentrações de nutrientes sobre a superfície sólida. Estes organismos incluem um grande número de fungos filamentosos e algumas bactérias, tais como os actinomicetos que podem crescer na forma filamentosa, sendo os fungos, particularmente empregados em fermentação sólida (SMITS *et al.*, 1998). Já os substratos sólidos podem ser vistos como uma mistura gás-líquido-sólido na qual a fase aquosa está intimamente associada com a superfície sólida que, por sua vez, está em contínuo contato com a fase gasosa do ambiente externo. A interface gás-líquido proporciona uma fronteira para a troca gasosa e transferência de calor. Já a fase sólida úmida proporciona uma fonte rica e complexa de nutrientes que pode ser completa ou incompleta no que diz respeito ao requerimento nutricional do microrganismo a ser cultivado (MUDGETT, 1986).

Fungos filamentosos tais como *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus* e *Penicillium* são importantes microrganismos utilizados na FES, pois crescem naturalmente em frutas e grãos ou sobre resíduos agrícolas lignocelulósicos e amiláceos (NIGAM & SINGH, 1994). Estes fungos crescem na superfície de substratos sólidos de um modo similar às raízes das plantas crescendo no solo (NIGAM & SINGH, 1994). O longo corpo tubular da hifa dos fungos cresce junto à partícula sólida, utilizando a fina camada líquida da superfície como fonte de umidade e nutrientes, penetrando nas fendas e no interior do substrato para chegar aos nutrientes mais distantes. As extremidades das hifas do fungo se alongam e produzem enzimas ativas para converter o polímero natural em açúcares metabolizáveis. Estes microrganismos,

quando em ambiente de FES, crescem sob condições muito próximas de seus ambientes naturais e podem estar aptos a produzir certas enzimas e metabólitos que normalmente não seriam produzidos em fermentação submersa (FSm) (RAMANA MURTHY, KARANTH & RAO 1993). Embora muito pouco seja conhecido sobre a base mecanística das diferenças observadas entre a FES e a FSm, é sabido que a expressão gênica em FES pode ser diferente daquela em FSm (NAGEL *et al.* 2002).

Em contraste com os procedimentos da fermentação submersa, a técnica da FES não está tão bem caracterizada sobre fundamentos científicos ou bases de engenharia e poucas informações estão disponíveis sobre o efeito do ambiente presente na FES (MUDGETT, 1986 e RAMANA MURTHY, KARANTH & RAO 1993). O mesmo acontece com o estudo da cinética do crescimento do fungo, que em FES não está bem fundamentada sobre bases teóricas, uma vez que não se tem estudos apropriados, no que diz respeito às características fisiológicas do microrganismo. Sendo assim, a obtenção de modelos que descrevam a cinética de crescimento do fungo não é fácil, particularmente devido à complexidade nutricional do substrato e à dificuldade em estimar a velocidade de formação da biomassa na presença do substrato.

Um sistema de FES apresenta complexidades que contribuem para que seu estudo sobre bases teóricas seja mais trabalhoso do que um estudo executado sobre um sistema de fermentação submersa utilizando um microrganismo unicelular. Entre estas, pode-se citar as seguintes:

- Fermentações tradicionais em substratos sólidos podem envolver culturas mistas com microrganismos próprios do meio, inoculados ou com ambos;
- Meios de cultivo sólidos naturais proporcionam fontes de carbono mistas e uma diversificada e complexa fonte de nutrientes que pode ou não ser completa no que diz respeito às exigências nutricionais do microrganismo a ser cultivado;
- Meios de cultivo tradicionais de fermentação submersa contêm compostos de carbono prontamente metabolizáveis. Entretanto, os substratos utilizados em FES tipicamente são biopolímeros de alto peso molecular como amido, celulose, hemicelulose, pectina, proteína e lipídios, os quais requerem hidrólise enzimática para sua assimilação no crescimento.

- A mistura de compostos de carbono de baixo e alta massa molar conduzem a um complexo padrão de indução, repressão e inibição na regulação do metabolismo microbiano;
- Os fungos comumente empregados em fermentações sólidas são obrigatoriamente aeróbios e necessitam obter oxigênio da fase gasosa, sendo que na FES as condições são relativamente estagnadas para a transferência gasosa;
- A densidade da biomassa na fase líquida da FES pode ser muito alta, levando a uma demanda extrema de oxigênio e aumentando a taxa de liberação de dióxido de carbono nos estágios tardios da fermentação. Sendo o processo metabólico exotérmico, a taxa de calor gerada na formação da biomassa microbiana pode ser grande e pode haver dificuldade na remoção de calor quando sob condições estagnadas;
- O crescimento de um fungo em FES pode ser extremamente sensível ao cisalhamento; neste caso o sólido não pode ser agitado vigorosamente.

Devido à importância, serão descritas a seguir algumas variáveis operacionais bem como variáveis do processo que são consequências da complexidade do sistema bem como operacionais.

2.1.3.1 Temperatura e transferência de calor

O crescimento microbiano é um processo exotérmico e o calor gerado deve ser dissipado, pois altas temperaturas não são favoráveis para a crescimento dos microrganismos bem como para a formação do produto (MITCHELL & LONSANE, 1992; GHILDYAL *et al.*, 1994). Isto é, quando um processo de FES se inicia, a temperatura é a mesma em qualquer ponto do leito fermentativo. Porém, com o progresso da fermentação acontecem as reações metabólicas nas células microbianas, que por sua vez começam a liberar calor. Um mecanismo de transferência de calor em FES em um biorreator de bandeja foi descrito por PRIOR, PREEZ & REIN (1992): (a) o calor é transferido do sólido para a fase gasosa por condução; (b) então, por convecção natural da fase gasosa para a superfície do leito; (c) e então, por convecção para a atmosfera. Entretanto, este calor não é

facilmente dissipado devido à baixa condutividade térmica do substrato (MOO-YOUNG, MOREIRA & TENGEDY, 1983; MUDGETT, 1986; LONSANE *et al.*, 1991; PRIOR, PREEZ & REIN, 1992). Como resultado, o superaquecimento consiste em um sério problema na FES em maiores escalas, pois a temperatura geralmente sobe para níveis que inibem o crescimento e a formação do produto, podendo até impedir a sobrevivência do fungo no sistema. Mesmo que estas temperaturas tão elevadas não sejam atingidas, o fungo é geralmente exposto a temperaturas significativamente acima da ótima para seu crescimento por longos períodos durante a fermentação (IKASARI, MITCHELL & STUART, 1999). Devido à dificuldade na remoção do calor formam-se gradientes de temperatura, podendo ocorrer a formação de zonas com temperatura alta que afeta negativamente o crescimento microbiano e a formação do metabólito desejável. A quantidade de calor metabólico gerado durante a FES pode chegar a 14960 Btu/kg de sólido seco (LONSANE *et al.*, 1985) e um gradiente de temperatura de 3°C/cm foi alcançado durante a fase de crescimento rápido em fermentador com leite de farelo de trigo de 6,5 cm de profundidade (RATHBUN & SHULER, 1983). LU, LI & WU (2003) relatam um estudo piloto de biorreator de bandeja em que um pico de temperatura de 45°C ocorreu a 1,0 – 1,2 cm de profundidade enquanto que a temperatura na superfície foi de 31 – 32°C, durante a fase de crescimento rápido de *A. sulphureus*. GHILDYAL *et al.* (1994), incubando *A. niger* em um biorreator de leite empacotado, encontraram uma temperatura de 52°C nas 20 primeiras horas, durante um cultivo em que a temperatura inicial foi de 28°C. Esta variação de temperatura que ocorre durante o processo de FES proporciona uma condição não isotérmica que é típica deste sistema e representa uma das diferenças essenciais entre a FES e a FSm. Portanto, a temperatura é uma variável ambiental de grande influência sobre a cinética de crescimento do microrganismo envolvido, sendo importante incluir seus efeitos nos modelos de FES (RAJAGOPALAN & MODAK, 1994; SMITS *et al.*, 1998).

O calor gerado pela atividade metabólica do microrganismo é o principal problema associado com o aumento de escala da FES (SAUCEDO-CASTANEDA *et al.*, 1992) e sua remoção por condução quando a fermentação acontece em leitos estáticos é limitada devido a: (a) baixa transferência de calor pelo leite (SAUCEDO-CASTANEDA *et al.*, 1990); e (b) falta de área superficial adequada para troca de calor em biorreatores de grande escala. O resfriamento evaporativo tem provado ser

mais eficiente que os processos de condução e convecção (SARGANTANIS *et al.*, 1993), mas resulta em uma grande perda de umidade e secagem do substrato sólido (NARAHARA *et al.*, 1984), o que torna essencial combinar controle de umidade e temperatura em sistemas de FES de grande escala (LONSANE *et al.*, 1991; SAUCEDO-CASTANEDA *et al.*, 1992; HAN & NOUT, 2000).

O superaquecimento é um sério problema em FES e, geralmente, não pode ser evitado. As mudanças temporais na temperatura dentro do ambiente da FES causam danos ao fungo e entre os seus vários efeitos adversos destacam-se os seguintes:

a) Efeitos sobre o crescimento e atividades metabólicas, onde temperaturas elevadas podem causar alterações na composição lipídica das membranas e na produção de proteínas especiais como as proteínas de choque térmico (FEOFILOVA, 1994); alteração na qualidade e quantidade dos ribossomos (YUN, HONG & LIM, 1996); inibição da germinação dos esporos e aumento do raio da hifa (TRINCI, 1984).

b) Efeitos sobre a síntese de enzimas, onde é descrita uma diminuição dos rendimentos de protease e glucoamilase em virtude do aumento na temperatura de cultivo (GHIDYAL *et al.*, 1994 e IKASARI, 1997) e uma diminuição da velocidade de produção da glucoamilase (GHILDYAL *et al.*, 1993). Além destas, a produção de xilanase diminuiu consideravelmente quando a temperatura de cultivo aumentou (LU, LI & WU, 2003). Por outro lado, TAO *et al.* (1997) não obtiveram efeitos adversos sobre a produção de celulase quando a temperatura oscilou entre 30-50 °C no cultivo de *Trichoderma viride*.

c) Efeitos adversos sobre o substrato, onde o superaquecimento pode levar a uma diminuição da umidade do substrato que pode chegar a níveis muito baixos devido a evaporação da água (RAMANA MURTHY, KARANTH & RAO 1993).

2.1.3.2 pH

Em fermentações sólidas é muito difícil o controle do pH. Conseqüentemente, é desejável que o microrganismo tenha uma certa tolerância às alterações na concentração de prótons. Note-se que o intervalo de pH ideal para o crescimento microbiano e aquele para a formação do produto podem diferir consideravelmente (PRIOR, PREEZ & REIN, 1992). A medida desta variável também é difícil, visto que o pH da fase líquida contida dentro das partículas, aquele que se obtém pela suspensão do meio sólido em água destilada, pode ser consideravelmente diferente daquele na superfície do sólido, próximo de onde ocorre a maior parte das reações biológicas (MUDGETT, 1986). No entanto, muitos meios de cultivo utilizados em FES apresentam uma boa capacidade tamponante, diminuindo a necessidade de controle desta variável (PALMA, 2003).

2.1.3.3 Atividade de água e umidade

A disponibilidade de água ao microrganismo pode ser definida em termos de atividade de água (a_w) do ambiente, ao contrário do teor de umidade do substrato sólido. A atividade de água é definida como sendo a razão entre a pressão de vapor da água no substrato (p) e a pressão de vapor da água pura (p_0). Grande parte das bactérias crescem em alta a_w (acima de 0,98) enquanto que muitos fungos podem crescer em valores mais baixos (0,90 – 0,95). Os microrganismos que são capazes de executar suas atividades metabólicas em a_w inferiores, tais como os fungos filamentosos, são os mais apropriados para os processos de fermentação em estado sólido (NIGAM & SINGH, 1994).

O nível de umidade para um determinado valor de atividade de água é influenciado pela natureza do substrato. Uma umidade muito alta resulta em um leito com baixa porosidade e baixa difusão do oxigênio, aumentando o risco de contaminação bacteriana, formação de um micélio aéreo e a diminuição da troca gasosa (LONSANE *et al*, 1985). O teor de umidade inicial que geralmente varia na faixa de 30 – 75%, muda durante o curso da fermentação devido à evaporação e às atividades metabólicas.

2.1.3.4 Aeração e agitação

A aeração e a agitação são operações críticas para prover um suprimento de oxigênio adequado para manutenção das condições aeróbicas e dissipar o excesso de dióxido de carbono liberado durante a fermentação.

Entretanto, muitas fermentações não podem ser agitadas vigorosamente (MUDGETT, 1986), uma vez que uma forte agitação pode danificar o micélio. Por outro lado, a agitação tem seus efeitos benéficos como proporcionar uma homogeneidade durante todo o período da fermentação, promover o crescimento sobre partículas individuais do substrato, expor as partículas do substrato à atmosfera do biorreator, promover a transferência de gás e de calor e promover uma efetiva distribuição do inóculo no início do processo (LONSANE *et al.*, 1985).

A aeração implica não somente na transferência de gás, mas também na transferência de umidade e calor entre o sólido fermentando e o ambiente gasoso (MUDGETT, 1986). Devido à importância da aeração na remoção de calor, muitas vezes a vazão de entrada do ar é determinada pelas necessidades de remoção de calor, e as vazões utilizadas para a remoção deste calor são mais do que suficientes para manter altas as concentrações de O₂ nos poros do leito fermentativo.

2.1.3.5 Determinação da Biomassa

A determinação do teor de biomassa dentro do leito consiste em um dos principais problemas nos estudos envolvendo a FES, sendo este parâmetro importante para o monitoramento do curso de qualquer processo fermentativo. Sua estimativa direta é difícil devido à capacidade dos fungos filamentosos em penetrar profundamente nas partículas do meio de cultivo por meios enzimáticos e mecânicos (LONSANE *et al.*, 1985). O micélio torna-se intrincadamente emaranhado com o substrato sólido e a sua separação quantitativa é usualmente impossível. Por estas razões, métodos diretos para a determinação da biomassa de fungos filamentosos em FES não podem ser aplicados (LEKHA & LONSANE, 1994). No entanto, MITCHELL (1989) desenvolveu um método para estudar o sistema de FES que consistiu no crescimento de fungos filamentosos sobre uma membrana aderida a um meio solidificado com κ -carragenana contido numa placa de Petri. Nesta condição, o

crescimento do micélio se dá sobre a membrana, cuja porosidade não permite a penetração das hifas para o meio, mas é grande o suficiente para permitir a difusão dos nutrientes do meio para o microrganismo e de enzimas extracelulares para o meio. Este método é conveniente, rápido e exato (MITCHELL, DOELLE & GREENFIELD, 1989), e permite a total recuperação da biomassa, uma vez que esta cresce sobre a membrana. Este sistema imita as condições de um sistema real de FES, e pode ser útil para a calibração de métodos indiretos de medida de biomassa, uma vez que a similaridade do ambiente de crescimento permitiria uma similaridade na composição celular, similaridade esta não obtida em um processo de fermentação submersa (IKASARI, 1997).

Devido às dificuldades na medição direta da biomassa de microrganismos filamentosos em FES, métodos indiretos para esta determinação têm sido utilizados. Estes métodos monitoram componentes específicos da biomassa ou atividades metabólicas, mas podem apresentar limitações, tais como o fato de o teor dos diferentes componentes celulares sofrerem modificações significativas nos fungos devido às condições de crescimento e à idade da cultura (OOIJKAAS *et al.*, 1998). O teor de vários componentes da biomassa aumenta com o aumento da biomassa. Este é o caso do teor de proteínas, ergosterol, glucosamina e DNA e, portanto, potencialmente podem ser utilizados apenas como indicadores de crescimento. Para serem úteis como indicadores quantitativos do crescimento do fungo, o teor destes componentes no micélio deve ser constante durante o desenvolvimento e permanecer o mesmo sob diferentes condições de cultivo (DESGRANGES *et al.*, 1991), caso contrário um fator de conversão expresso como função do tempo será necessário para expressar a medida do componente celular ou atividade metabólica. Este fator deve ser determinado em um sistema que permita a medida direta da biomassa (IKASARI, 1997).

A seguir serão descritos os principais métodos indiretos que são utilizados para acompanhar o crescimento celular, e que são baseados ou em componentes da biomassa ou na atividade metabólica.

2.1.3.5.1 Componentes da biomassa:

Nitrogênio e Proteína:

A quantificação tanto de nitrogênio total quanto de proteínas pode ser utilizada para acompanhar o crescimento fúngico.

Para avaliar a proteína microbiana a partir da determinação do nitrogênio total tem sido utilizado o método de Kjeldhal (CARRIZALES *et al.*, 1981), pelo qual a proteína microbiana é calculada como sendo 6,25 vezes o valor de nitrogênio total fornecido pelo método. A principal fonte de erro para este método é a presença de nitrogênio que não é de origem fúngica, ou seja, o nitrogênio presente no substrato. Deve-se levar em consideração que a quitina da parede celular do fungo também contém nitrogênio, e que este contabilizará no resultado de nitrogênio total fornecido pelo método de Kjeldhal (LEKHA & LONSANE, 1994). Portanto, a determinação precisa da proteína microbiana por este método não é fácil de ser conseguida.

A proteína microbiana também pode ser estimada pelo método de Folin (MITCHELL *et al.*, 1991), e pelo reagente Coomassie Blue (CORDOVA-LOPEZ *et al.*, 1996). Este último consiste em um reagente sensível, estável, simples e menos sujeito a interferências que o método de Folin (CORDOVA-LOPEZ *et al.*, 1996). No entanto, quando se utiliza o reagente Coomassie Blue, os resultados podem ser pouco precisos devido à utilização de padrões inadequados, deve ser utilizado um padrão de proteína com composição similar e a ligação proteína-corante é conseguida com proteínas de alta massa molar. As condições de extração das proteínas não deve clivá-las.

Além disto, assume-se que o teor de proteína é constante durante todo o ciclo de crescimento celular. Entretanto, o teor de proteína depende do estado metabólico da biomassa (IKASARI, 1997), uma vez que durante o período de desaceleração, o peso seco do fungo ainda aumenta devido ao acúmulo de produtos de estocagem como polissacarídeos (Garaway & Evans, 1984 citados por IKASARI, 1997), indicando uma diminuição no teor de proteínas.

Ainda deve-se levar em conta que em sistemas reais de FES o meio de cultivo pode ter um valor alto de proteína. Nesta situação, um aumento no teor da proteína em função do crescimento fúngico pode ser de difícil observação, especialmente dada a possibilidade do fungo poder degradar a proteína presente no substrato.

Glucosamina:

A glucosamina é geralmente utilizada como um indicador de crescimento, uma vez que está presente nos fungos e não é encontrada em materiais vegetais comumente utilizados como substratos na FES. A glucosamina faz parte da quitina que é um polímero presente na parede celular dos fungos (IKASARI, 1997). Sua determinação quantitativa envolve a despolimerização da molécula de quitina seguido da dosagem da glucosamina liberada. Porém, o teor de glucosamina nos fungos pode variar com a composição do meio e condições de cultivo (DESGRANGES *et al.*, 1991; TOMASELLI-SCOTTI *et al.*, 2001). Nos fungos cultivados em sistema de FES, foram descritos valores 10-30% inferiores no teor de glucosamina quando comparados aos valores alcançados em cultivo de fermentação submersa (MOO-YOUNG, MOREIRA & TENGEDY 1983 e SMITS *et al.*, 1996).

Uma vez que o teor de glucosamina nem sempre permanece constante durante o crescimento do fungo (AIDOO, HENDRY & WOOD, 1981; DESGRANGES *et al.*, 1991), seria necessário um fator de conversão expresso com função do tempo que relaciona o teor de glucosamina com a massa seca do micélio. NAGEL *et al.* (2001) utilizaram a glucosamina como um indicador de crescimento de *Aspergillus oryzae* cultivado em grãos de trigo e tentaram solucionar este aspecto caracterizando as alterações do teor de glucosamina na composição celular. Para isto, os autores utilizaram o sistema *overculture* (seção 2.1.4) no qual a glucosamina e a massa seca da biomassa fúngica poderiam ser medidas simultaneamente e estabeleceram uma equação empírica para descrever o comportamento do teor de glucosamina na biomassa (mg de glucosamina/g de biomassa seca) G_x , em função do tempo (t):

$$G_x(t - \lambda) = 44,61 + \frac{43,65}{(1 + \exp(-\frac{((t - \lambda) - 61,70)}{12,34}))} \quad (2.1)$$

onde λ corresponde a fase lag (h) e t é o tempo (h). De acordo com os autores, esta estratégia permite que a medida da glucosamina na fermentação em sistema real de FES possa ser convertida na correspondente massa seca da biomassa fúngica.

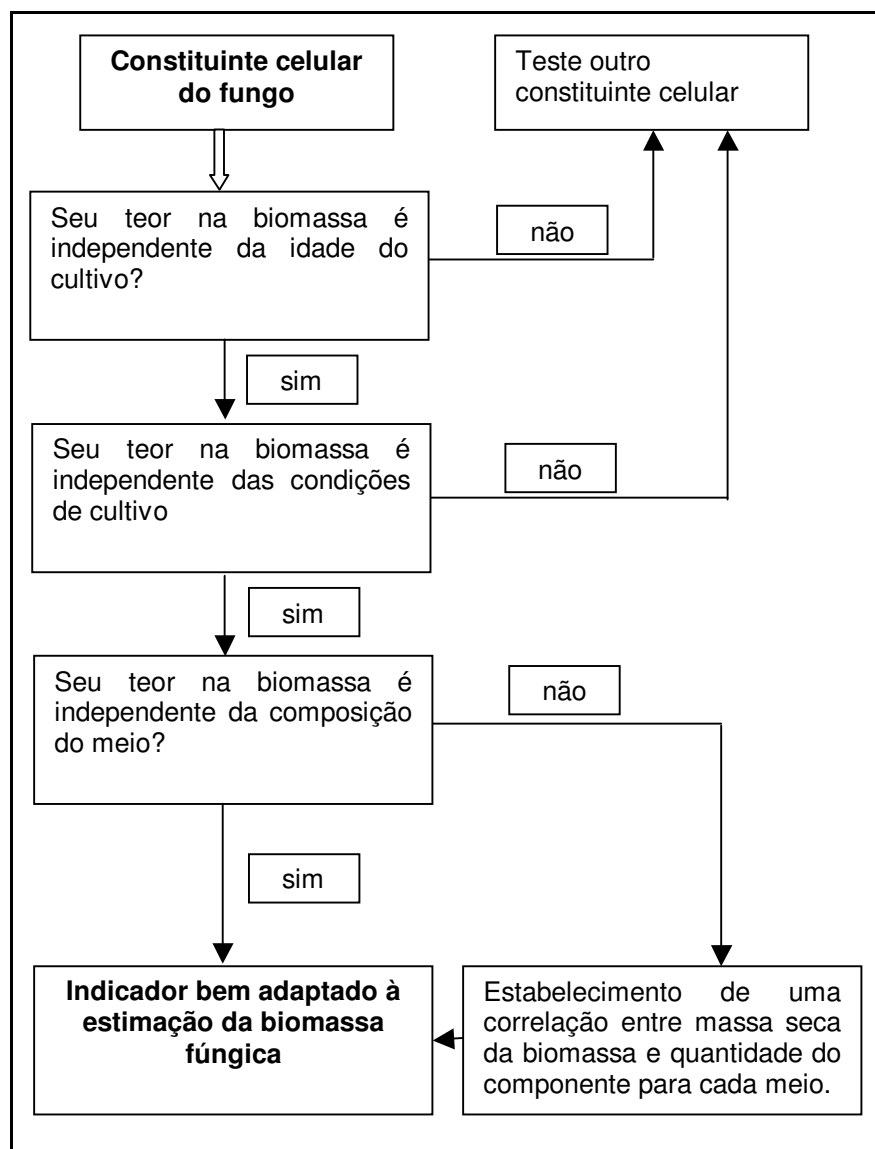
Entretanto, a variação do teor de glucosamina na biomassa fúngica não é necessariamente a mesma em um sistema de cultivo artificial (como o cultivo em *overculture*) e em um sistema real de FES. Entretanto, quanto mais próximo o ambiente de crescimento proporcionado por um sistema artificial de FES for de um ambiente real de FES, mais próximos irão ser os teores de glucosamina na biomassa do fungo cultivado no sistema artificial e no sistema real de FES. Entretanto, é impossível de se ter uma completa certeza disto (MITCHELL *et al.*, 2004).

Ergosterol:

O ergosterol é o esteroide predominante nos fungos, fazendo parte de sua membrana celular (LEKHA & LONSANE, 1994), e pode ser determinado quantitativamente. Porém, seu teor nos fungos nem sempre é constante, podendo variar sob certas circunstâncias. DESGRANGES *et al.* (1991) verificaram que este componente celular variou durante todo o desenvolvimento do fungo *Beauveria bassiana* e com diferentes composições dos meios, concluindo assim que o ergosterol não permite uma boa estimativa do crescimento micelial. Vinte (20) espécies de fungos foram avaliadas quanto ao teor de ergosterol (BARAJAS-ACEVES *et al.* 2002). Alguns microrganismos apresentaram alterações significativas do teor de ergosterol de acordo com o estado fisiológico em que se encontravam, obtendo-se valores altos deste componente celular na fase estacionária.

Portanto, ao se fazer uso de um componente da biomassa como forma de acompanhamento indireto do seu crescimento, é necessário conhecer se este componente pode ser utilizado como um indicador quantitativo do seu crescimento. Desta maneira, o fluxograma representado na Figura 2.1 mostra uma progressão lógica e geral a ser aplicada antes da utilização de um constituinte celular para medir indiretamente a biomassa num sistema de FES (TOMASELLI SCOTTI *et al.*, 2001).

FIGURA 2.1 – FLUXOGRAMA PARA VALIDAÇÃO DE UM COMPONENTE CELULAR COMO INDICADOR INDIRETO DO CRESCIMENTO



Como mostra a Figura 2.1, é imperativo para a seleção de um constituinte celular que o mesmo seja constante na biomassa durante todo o ciclo de crescimento. Do mesmo modo, as condições de cultivo (meio sólido ou líquido) não devem influenciar a quantidade do constituinte celular escolhido. Por outro lado, se um ou vários componentes do meio resultar em variações, correlações prévias precisam ser estabelecidas para cada meio testado.

2.1.3.5.2 Atividades metabólicas

Consumo de O₂ e desprendimento do CO₂:

Durante o metabolismo aeróbico dos fungos filamentosos, o O₂ é consumido enquanto o CO₂ é liberado.

A medida do desprendimento do CO₂ pode ser relacionada ao desenvolvimento da biomassa, como mostrado por CARRIZALEZ, RODRIGUEZ & SARDINA. (1981), SMITS *et al.* (1996), BRAMORSKI *et al.* (1998a), CRUZ-CÓRDOVA *et al.* (1999).

O consumo de O₂ pode ser acompanhado pela medida da diminuição da concentração de oxigênio no *headspace* de um “frasco-reator” fechado por meio de um analisador paramagnético de O₂ (SATO *et al.*, 1983; ORIOL *et al.*, 1988; SMITS *et al.*, 1996) ou também por um respirômetro (SATO & TODA, 1983) podendo ser relacionado ao crescimento dos fungos filamentosos.

Estas medidas, do desprendimento de CO₂ e do consumo de O₂, são rápidas e simples, mas de acordo com IKASARI (1997) devem estar acopladas a um modelo de correlação destas atividades com o crescimento.

O desprendimento de CO₂ pode ser relacionado ao crescimento e manutenção das células pela seguinte expressão (Okasaki *et al.*, 1980; Sato & Yoshizawa, 1988, citados por IKASARI, 1997):

$$CER = \frac{1}{Y_{X/CO_2}} \frac{dX}{dt} + mX \quad (2.2)$$

CER = velocidade de produção de CO₂ (mmol.g/min)

Y_{X/CO₂} = coeficiente de rendimento em biomassa a partir do CO₂ liberado

X = biomassa (g)

t = tempo (min)

m = velocidade específica de produção de CO₂ relacionado à manutenção das células

O consumo de oxigênio em sistemas de FES pode ser relacionado ao crescimento e manutenção celular com a seguinte equação (SATO *et al.*, 1983; SOCCOL *et al.*, 1993):

$$\text{OUR} = \frac{1}{Y_{x/o}} \frac{dX}{dt} + mX \quad (2.3)$$

OUR = velocidade de consumo de oxigênio (*oxygen uptake rate*) (mmol.g/min)

$Y_{x/o}$ = fator de conversão de oxigênio em células

X = biomassa (g)

t = tempo (min)

m = velocidade específica de consumo de oxigênio para a manutenção das células

Utilizando dados da velocidade de consumo de oxigênio e do desprendimento de CO₂, os parâmetros Y e m são extraídos. Para tanto, há a necessidade de utilizar-se de técnicas numéricas e *softwares* apropriados para resolver as equações acima, sendo necessário resolver uma equação que contém a variável (X) e sua derivada (dX/dt) simultaneamente.

Para aplicar as Equações 2.2 e 2.3 e estimar o crescimento do fungo baseado no monitoramento do consumo de O₂ ou no desprendimento de CO₂, os valores de Y e de m precisam ser constantes durante todo o crescimento. Isto implica em uma limitação do método, já que, muito freqüentemente, este fato não é observado, sendo então necessário a determinação de valores para cada fase de crescimento celular (SATO *et al.*, 1983). Alguns fatores que acontecem durante um processo de FES são responsáveis por esta variação observada nos coeficientes Y e m: 1) distribuição não uniforme dos nutrientes e do consumo de diferentes fontes de carbono nos diferentes estágios do crescimento; 2) alterações no ambiente (como a concentração de nutrientes e pH), as quais alteram os resultados de crescimento celular; 3) mudanças fisiológicas no microrganismo (SATO *et al.*, 1983).

Apesar do fato de Y e m não permanecerem constantes, levando a uma imprecisão na determinação da biomassa, esta técnica é promissora uma vez que é simples, prática e igualmente rápida para estimar o desempenho de uma FES devido à habilidade de monitoramento *on-line* (IKASARI, 1997).

2.1.4 Sistema *Overculture*

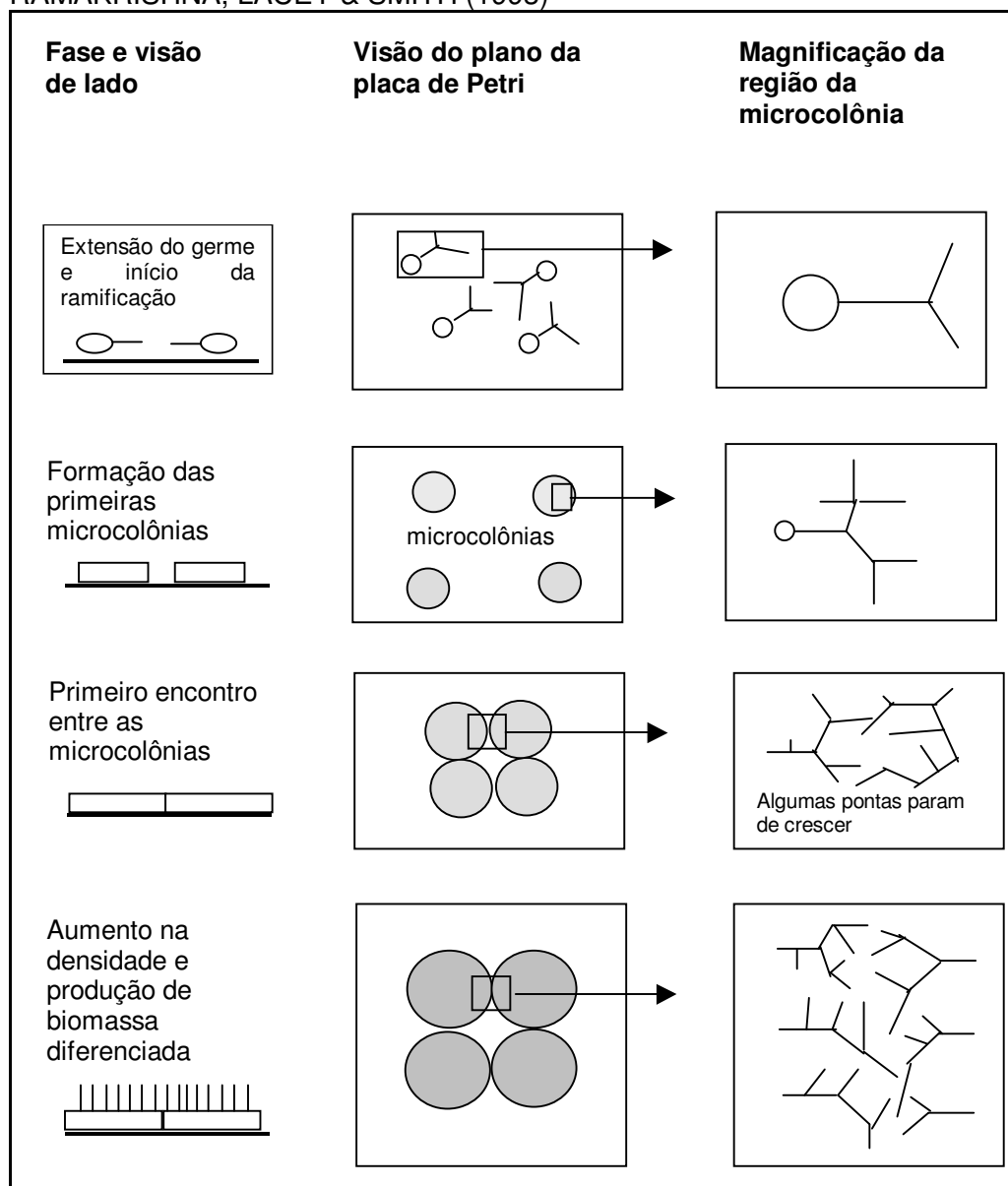
Como discutido anteriormente, a quantificação da biomassa é um ponto crítico na FES. Sua medida direta é impossível e sua estimativa por indicadores indiretos é imprecisa. Por outro lado, as atividades metabólicas, como o consumo de oxigênio e a liberação do gás carbônico, podem ser relacionadas ao crescimento celular desde que se possa determinar a biomassa (X).

O crescimento de fungos filamentosos sobre uma membrana aderida a um meio solidificado numa placa de Petri, como sugerido por MITCHELL (1989) permite, além da difusão dos nutrientes do meio para o fungo e de enzimas extracelulares para o meio; a total recuperação da biomassa. Isto torna possível a determinação da massa seca do micélio ao longo de um cultivo. Este tipo de cultivo recebeu o nome de “sistema *overculture*” e caracteriza-se pelo crescimento do microrganismo a partir de inúmeros pontos após o espalhamento de uma suspensão de esporos sobre a superfície do meio ou de uma membrana colocada sobre o meio, dependendo de características próprias do microrganismo utilizado. O crescimento destas múltiplas colônias a partir de inúmeros pontos mimetiza a situação em FES melhor que o crescimento de uma única colônia. No crescimento de uma única colônia, o micélio se espalha a partir de um ponto central e, a partir daí, cada hifa na beira da colônia estende-se continuamente em direção ao meio ainda não colonizado. Como resultado a idade do micélio varia ao longo do raio da colônia.

Diferentemente, tanto na FES como no sistema *overculture*, o micélio se estende a partir de muitos esporos e logo se encontram e uma grande parte da fermentação envolve um aumento na densidade micelial, sem nenhuma heterogeneidade sobre a superfície. Esta seção descreve os fenômenos microscópicos envolvidos no crescimento do fungo quando cultivado em sistema *overculture*. A Figura 2.2 , adaptada de IKASARI & MITCHELL (2000) mostra as

fases de desenvolvimento de cultivos em sistema *overculture*, baseadas nas observações de RAMAKRISHNA, LACEY & SMITH (1993), que descreveram qualitativamente a germinação, o crescimento e as interações entre as hifas durante o crescimento do fungo sobre grãos de cevada individuais.

FIGURA 2.2 – FASES DO DESENVOLVIMENTO DO FUNGO CULTIVADO EM SISTEMA *OVERCULTURE* BASEADO NAS OBSERVAÇÕES DE RAMAKRISHNA, LACEY & SMITH (1993)



Fonte: IKASARI, 1997

O crescimento proporcionado pelo sistema *overculture* pode ser dividido em quatro fases: 1) germinação dos esporos; 2) desenvolvimento e expansão das

microcolônias, 3) contato entre as microcolônias e, 4) aumento da densidade micelial sem expansão.

A fase de germinação dos esporos se inicia com o espalhamento da suspensão de esporos sobre a superfície do meio. Durante esta fase, os esporos incham e germinam. A germinação é seguida pela formação de hifas vegetativas que se estendem e começam a se ramificar.

Durante a segunda fase, as hifas em desenvolvimento nas microcolônias ocupam os espaços livres da superfície do meio. A massa de cada microcolônia aumenta exponencialmente devido à baixa densidade das hifas e a disponibilidade de áreas de meio desocupado contendo nutrientes. A duração deste período depende da distância inicial entre os esporos. As interações entre as pontas das hifas são negligenciáveis, então todas as pontas são fisiologicamente idênticas (Kotov & Reshetnikov, 1990 citado por IKASARI & MITCHELL, 2000).

Durante a terceira fase, tão logo as microcolônias se encontram, podem ocorrer muitas interações entre pontas de hifas e entre hifas e, como consequência, algumas pontas podem parar de se estender. A depleção nutricional e o acúmulo de inibidores também podem afetar o crescimento (IKASARI & MITCHELL, 2000).

Na quarta fase, devido à total ocupação da superfície do meio, o avanço do crescimento pode ocorrer apenas pelo aumento na densidade em áreas do substrato que já foi colonizado. O crescimento vegetativo pode parar e ser seguido pelo processo de diferenciação, como o desenvolvimento de hifas aéreas ou de estruturas de reprodução.

Poucos trabalhos têm sido realizados para modelar o crescimento de microrganismos cultivados em sistema *overculture*, apesar deste sistema permitir a total recuperação da biomassa e mimetizar o ambiente proporcionado pela FES melhor que o cultivo em meio líquido. Entre as investigações que fizeram uso deste tipo de cultivo pode-se citar: MITCHELL (1989), NOPHARATANA, HOWES & MITCHELL (1998), IKASARI, MITCHELL & STUART (1999), IKASARI & MITCHELL (2000), NAGEL *et al.* (2001), HAMIDI-ESFAHANI, SHOJAOSADATI & RINZEMA (2004). Esta técnica de cultivo permite que o microrganismo cresça de uma maneira fisiologicamente próxima daquela quando crescido sobre grãos, que são comumente utilizados como meio de fermentação em FES. Desta maneira, esta técnica, melhor que qualquer outra, fornece uma aproximação com um sistema real de FES e

permite a total recuperação da biomassa, facilitando, desta forma, os estudos cinéticos de crescimento e conseqüentemente a modelagem matemática tão importante para o aumento de escala da FES.

2.1.5 A Importância da Modelagem Matemática em FES

Os modelos matemáticos são essenciais para o entendimento dos processos que limitam o crescimento em FES e também para o projeto racional e controle de biorreatores de FES de grande escala (SANGSURASAK, NOPHARATANA & MITCHELL, 1996). A otimização e o controle das condições da fermentação são de grande importância para uma produtividade máxima de biomassa e metabólitos (HAN & NOUT, 2000). Em outras palavras, é necessário conhecer e manter as condições ideais durante todo o processo, para que uma alta produtividade em biomassa e também em metabólitos de interesse seja alcançada. Entretanto, em FES não é simples manter as condições nos valores ideais e, como conseqüência, o microrganismo está sujeito às variações de algumas variáveis importantes. Assim, em um processo de FES, um modelo matemático que descreva o comportamento do microrganismo frente a alterações nas condições ambientais é de extrema importância.

Existem poucos estudos sobre o crescimento de microrganismos frente às variações nas condições ambientais na literatura especializada em FES, mas existem alguns estudos em áreas relacionadas como a microbiologia de alimentos. O interesse nos estudos desta área consiste em poder prever o crescimento de bolores em produtos manufaturados e em grãos. As conseqüências do crescimento de microrganismos filamentosos em alimentos vão desde a deterioração do produto até a contaminação destes por metabólitos tóxicos (micotoxinas), produzidas por alguns bolores comumente colonizadores de alimentos, constituindo um risco para a saúde pública.

A temperatura é um dos principais fatores que influenciam o crescimento de um microrganismo em estado sólido e mudanças significativas são praticamente impossíveis de serem evitadas em biorreatores de FES de larga escala. Portanto, o conhecimento de como as variações de temperatura influenciam o crescimento do

microrganismo e a sua incorporação nos modelos cinéticos embutidos em modelos de biorreatores é relevante.

2.1.6 Fenômenos que Influenciam o Comportamento de um Biorreator

Os vários fenômenos que influenciam o comportamento de um biorreator de FES podem ser divididos em 2 categorias: fenômenos de microescala e fenômenos de macroescala (MITCHELL, von MEIEN & KRIEGER, 2003).

Os fenômenos de microescala são aqueles que ocorrem sobre e no interior das partículas individuais. Estes fenômenos incluem:

- a) Velocidades de crescimento e morte do microrganismo em resposta às condições ambientais;
- b) A forma do crescimento microbiano, isto é, se ocorre na forma micelial ou como um biofilme de organismos unicelulares;
- c) O efeito do crescimento microbiano sobre o ambiente, provocado pela liberação do calor, enzimas e produtos do metabolismo além do consumo de nutrientes;
- d) Difusão dentro das partículas (difusão intrapartícula) de compostos tais como O_2 , CO_2 , prótons, enzimas, nutrientes solúveis, produtos de hidrólise e produtos do metabolismo;
- e) Transferência entre regiões interpartículas e as partículas e entre a biomassa e as partículas do meio de cultivo de compostos tais como O_2 , CO_2 , água, e produtos voláteis do metabolismo;
- f) Destruição da partícula devido ao crescimento do microrganismo, se a fonte de carbono contribui para a estrutura física da partícula sólida.

Estes fenômenos são intrínsecos à FES e ocorrem em todos os biorreatores. De fato, pouco pode ser feito para influenciá-los no modo pelo qual o biorreator é projetado e operado, uma vez que ocorrem na superfície, dentro e entre as partículas individuais do meio de cultivo (MITCHELL, BEROVIC & KRIEGER, 2000).

Apesar da possibilidade limitada de interferência nestes processos que ocorrem dentro de um biorreator, é essencial entender a sua influência sobre o sistema.

Os fenômenos de macroescala são aqueles que envolvem o leito e o biorreator como um todo. Eles incluem (MITCHELL, BEROVIC & KRIEGER, 2000):

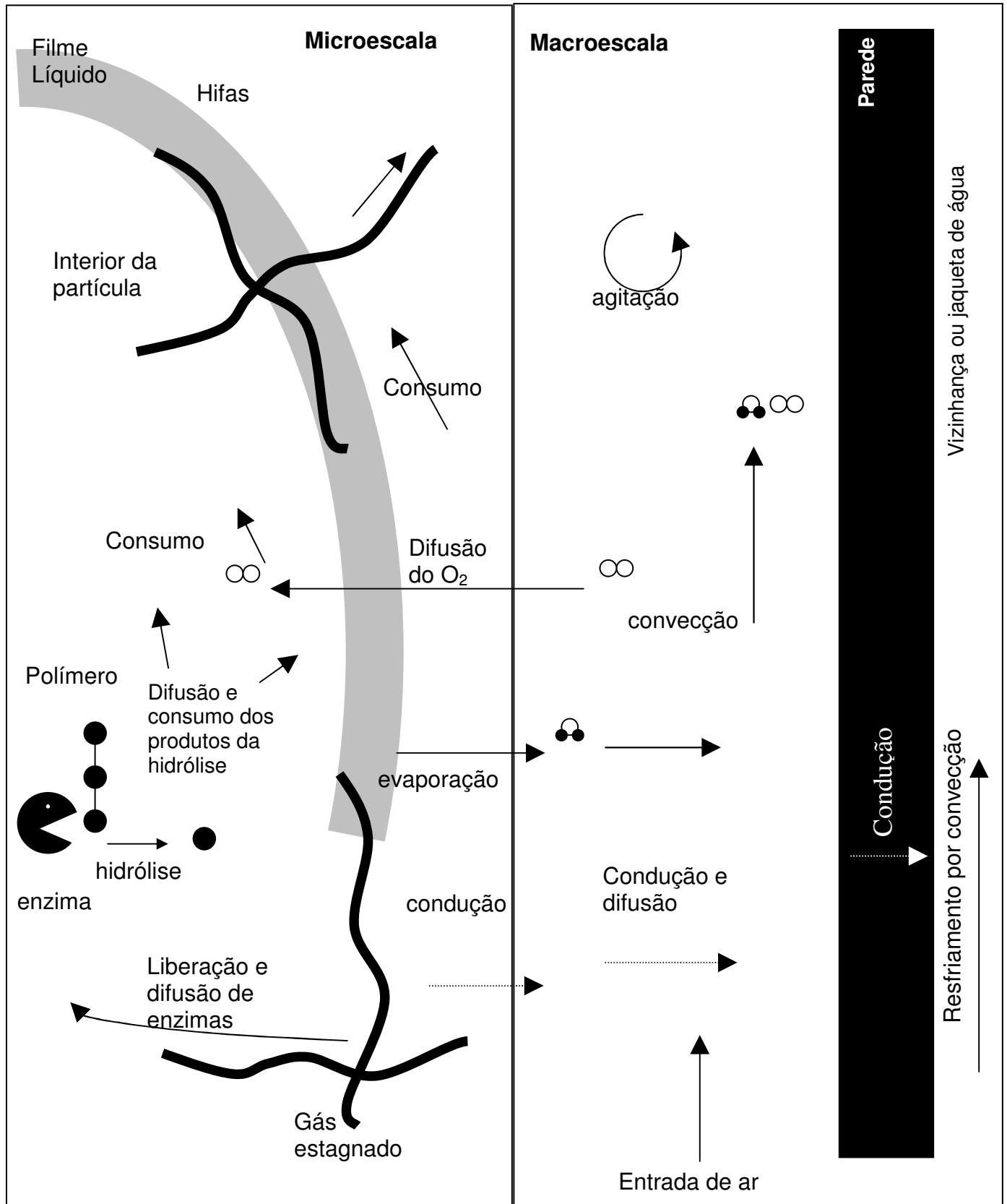
- a) Fluxo de entrada e saída de ar do biorreator, transportando energia sensível, O_2 , CO_2 e água;
- b) Fluxo de ar nos espaços entre as partículas, transportando energia sensível, O_2 , CO_2 e água, se o biorreator é agitado ou operado com aeração forçada;
- c) Condução pela parede do biorreator e o esfriamento convectivo nos arredores, que seria o ar em volta da parede ou água numa camisa de resfriamento;
- d) Efeito do cisalhamento causado pela agitação dentro do biorreator, incluindo danos ao microrganismo e à integridade das partículas do meio de cultivo.

Estes fenômenos de macroescala têm importâncias relativas diferentes nos vários tipos de biorreatores, conforme pode-se conferir na literatura:

- Reatores de bandejas: SMITS *et al.* (1999), IKASARI & MITCHELL (1998 b).
- Reatores de leitos fixos: MITCHELL *et al.* (1999), WEBER, TRAMPER & RINZEMA (1999), MITCHELL & VON MEIEN (2000), OOSTRA, TRAMPER & RINZEMA (2000).
- Reatores de leitos com aeração forçada e agitados intermitentemente:, BANDELIER, RENAUD & DURAND (1997), ASHLEY, MITCHELL & HOWES (1999).
- Reatores de leitos com aeração forçada e agitados continuamente: ASHLEY, MITCHELL & HOWES (1999), NAGEL *et al.* (2001).
- Reatores de cilindros rotatórios: MARSH *et al.* (2000), STUART *et al.* (1999), HARDIN, HOWES & MITCHELL (2001).

A Figura 2.3, adaptada de VICCINI *et al.* (2001), mostra os fenômenos de microescala e macroescala que acontecem em um biorreator de FES.

FIGURA 2.3 - FENÔMENOS DE MICRO E MACROESCALA QUE OCORREM NO INTERIOR DE UM BIORREATOR DE FES



2.1.7 Modelos Matemáticos de Biorreatores

O objetivo de um modelo de biorreator é descrever como o desempenho é afetado pelas variáveis operacionais que podem ser manipuladas na tentativa de controlar o processo. Por exemplo, um modelo matemático possibilitará previsões de como a velocidade, a umidade e a temperatura do ar de entrada no biorreator afetará a temperatura e o teor de umidade do leito do meio de cultivo, e assim, como estas variáveis do sistema afetarão o crescimento microbiano e a formação do produto. Desta maneira, os modelos de biorreatores podem ser visualizados como consistindo de 2 sub-modelos: um sub-modelo cinético e um sub-modelo de transporte/balanço. O sub-modelo de transporte/balanço descreve a transferência de massa e calor no interior e entre as várias fases do biorreator, enquanto que o sub-modelo cinético descreve como a velocidade de crescimento do microrganismo depende das variáveis-chave ambientais locais (MITCHELL, von MEIEN & KRIEGER, 2003).

Os modelos atuais de biorreatores enfocam os fenômenos de macroescala, ou seja, o sub-modelo de transporte/balanço que descreve em detalhes o transporte de calor e massa no leito e as trocas de massa e energia entre o leito e outros sub-sistemas do biorreator como a parede e o *headspace* (MITCHELL, von MEIEN & KRIEGER, 2003). Atualmente, os fenômenos de microescala são considerados como sendo complexos demais para serem descritos em detalhes no sub-modelo cinético. As razões para isto serão discutidas na próxima seção, mas cabe apontar aqui que, como resultado disto, o crescimento é descrito por uma equação cinética empírica. Esta equação descreve a forma básica do perfil de crescimento e tem expressões, também empíricas, para descrever os efeitos das variáveis ambientais nos seus parâmetros (MITCHELL *et al.*, 2000 & MITCHELL, BEROVIC & KRIEGER, 2000).

Como o objetivo deste estudo é a elaboração de um modelo matemático cinético empírico e não de um modelo de transporte/balanço, a ênfase desta revisão é dada apenas sobre os modelos matemáticos cinéticos, como pode-se acompanhar na próxima seção.

2.1.8 Os Modelos Cinéticos

Os modelos cinéticos que fazem parte de um modelo de biorreator descrevem como a velocidade de crescimento do microrganismo depende das variáveis ambientais chaves. Para isto, o sub-modelo cinético pode envolver ou simples equações empíricas ou equações “mecanísticas” que tentam descrever os processos de difusão intrapartícula.

Os sub-modelos cinéticos mecanísticos incorporam termos derivados da cinética de crescimento, velocidade de difusão e consumo de substrato e de produção e difusão dos produtos finais. Tais modelos fornecem uma visão melhor do comportamento do sistema biológico do que aquela fornecida por equações empíricas, e são mais flexíveis, podendo prever o comportamento do sistema em condições além das testadas experimentalmente. Já os modelos empíricos descrevem o comportamento nas condições físico-químicas e nutricionais sob as quais um experimento é conduzido. São equações que podem descrever um perfil matematicamente, mas sem base teórica.

Devido à complexidade proporcionada pelo ambiente da FES, característica intrínseca deste processo, os modelos cinéticos mecanísticos têm proporcionado importantes conhecimentos sobre estes fenômenos que influenciam todo um processo de FES em nível da partícula de substrato (MITCHELL *et al.*, 2004). Porém, seriam complexos demais para serem incorporados dentro de um modelo de biorreator que já deve descrever os gradientes de temperatura e de outras variáveis dentro do leito. As equações necessárias para descrever tais gradientes são equações diferenciais parciais que requerem um grande esforço computacional para resolvê-las. Seriam exigidas horas, até dias, mesmo com um supercomputador, para resolver um modelo de biorreator que tentasse descrever tanto gradientes de temperatura na macroescala quanto gradientes de nutrientes na microescala, o que impediria uma tomada de decisões em tempo hábil para controlar o processo. Além disto, um grande esforço experimental seria necessário para determinar os parâmetros do modelo associados com a microescala. Como resultado, a maioria dos modelos atuais de biorreator utiliza sub-modelos cinéticos empíricos (MITCHELL, von MEIEN & KRIEGER, 2003).

Vários perfis cinéticos são encontrados na literatura para o sistema de FES: linear, exponencial, logístico e aceleração rápida/desaceleração lenta (duas fases). As equações empíricas que têm sido propostas para descrever tais curvas são mostradas na Tabela 2.2.

TABELA 2.2 FORMAS DIFERENCIADAS E INTEGRAIS DAS VÁRIAS EQUAÇÕES DE CRESCIMENTO EMPÍRICAS QUE TÊM SIDO APLICADAS EM SISTEMAS DE FES

Equação	Forma Diferenciada	Forma Integrada
Linear	$\frac{dX}{dt} = K$	$X = Kt + X_o$
Exponencial	$\frac{dX}{dt} = \mu X$	$X = X_0 e^{\mu \cdot t}$
Logística	$\frac{dX}{dt} = \mu X \left(1 - \frac{X}{X_{\max}} \right)$	$X = \frac{X_{\max}}{1 + \left(\frac{X_{\max}}{X_0} - 1 \right) e^{-\mu t}}$
Duas fases	$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad t < t_a$	$X = X_0 e^{\mu \cdot t} \quad t < t_a$
	$\frac{dX}{dt} = \mu L e^{-k(t-t_a)} X \quad t \geq t_a$	$X = X_A \exp \left[\frac{\mu L}{k} \left(1 - e^{-k(t-t_a)} \right) \right] \quad t \geq t_a$

X é a biomassa microbiana, t é o tempo, K é a velocidade de crescimento linear, μ é a constante da velocidade específica de crescimento, X_0 é a biomassa inicial, X_{\max} é a máxima biomassa microbiana possível, X_A é a biomassa no instante de troca das fases, que ocorre em tempo t_a , L é a fração da biomassa que sobrevive a troca das fases e k é o coeficiente de decaimento da biomassa viável durante a segunda fase.

Os modelos matemáticos de biorreatores de FES comumente utilizam a equação Logística (SAUCEDO-CASTAÑEDA *et al.*, 1990; RAGHAVA RAO *et al.*, 1993; SARGANTANIS *et al.*, 1993; RAJAGOPALAN & MODAK, 1994; ASHLEY, MITCHELL & HOWES, 1999; MITCHELL & von MEIEN, 2000), devido a sua simplicidade matemática. A equação Logística geralmente pode, numa única equação, proporcionar uma aproximação adequada de toda a curva de crescimento, incluindo a fase lag e a cessação do crescimento nos estágios tardios da

fermentação. Com outros modelos cinéticos, a curva de crescimento seria separada em várias fases, com diferentes equações para cada fase. Por exemplo, para o modelo linear, as fases lag e estacionária seriam reconhecidas em cada lado da região de crescimento linear, e seriam descritas pelo ajuste da velocidade de crescimento igual a zero (MITCHELL *et al.*, 2004).

Na equação Logística, a velocidade específica de crescimento é, geralmente, expressa como uma função da temperatura por uma equação empírica ajustada aos dados experimentais por regressão não-linear, como foi feito por SAUCEDO-CASTAÑEDA *et al.* (1990), SARGANTANIS *et al.* (1993), SANGSURASAK & MITCHELL (1995), ASHLEY, MITCHELL & HOWES (1999) e HAMIDI-ESFAHANI, SHOJAOSADATI & RINZEMA (2004).

SAUCEDO-CASTAÑEDA *et al.*, (1990) chegaram na seguinte equação para os dois parâmetros da equação Logística como uma função da temperatura:

$$\mu = \frac{2,694 \times 10^{11} e^{(-70225/8,314T)}}{1 + 1,300 \times 10^{47} e^{(-283356/8,314T)}} \quad (2.4)$$

e

$$X_m = -127,08 + 7,95(T - 273) - 0,016(T - 273)^2 - 4,03 \times 10^{-3}(T - 273)^3 + 4,73 \times 10^{-5}(T - 273)^4 \quad (2.5)$$

onde T é a temperatura absoluta em (K).

SARGANTANIS *et al.* (1993) expressaram os dois parâmetros da equação Logística com as seguintes equações:

$$\mu_M = \sqrt{(\mu_{MT})(\mu_{MW})} \quad (2.6)$$

e

$$X_M = \sqrt{(X_{MT})(X_{MW})} \quad (2.7)$$

onde os subscritos M , T e W denotam o “máximo”, a temperatura e a umidade, respectivamente; μ e X são a velocidade específica de crescimento e a biomassa, respectivamente. Os parâmetros μ_{MW} X_{MW} são expressos como polinômios, enquanto que os parâmetros μ_{MT} e X_{MT} são expressos como exponenciais em relação ao inverso da temperatura absoluta (T^{-1}). Entretanto, estes polinômios e exponenciais não foram relatados pelos autores.

A velocidade específica de crescimento μ_g foi expressa empiricamente como uma função da temperatura por ASHLEY, MITCHELL & HOWES (1999) de acordo com a seguinte equação:

$$\mu_g = \mu_{gopt}, \quad T = T_{opt}$$

$$\mu_g = \left(\frac{b + (T_{max} - T_{opt})}{(T_{max} - T_{opt})} \right) \left(\frac{\mu_{gopt} (T_{max} - T)}{b + (T_{max} - T)} \right), \quad T_{max} \geq T \geq T_{opt} \quad (2.8)$$

$$\mu_g = 0, \quad T = T_{max}$$

onde μ_{gopt} é a velocidade específica de crescimento na temperatura ótima para crescimento (T_{opt}) e T_{max} é a temperatura máxima na qual o crescimento pode ocorrer. O parâmetro b descreve a sensibilidade da velocidade específica de crescimento ao aumento da temperatura.

Mais recentemente, HAMIDI-ESFAHANI, SHOJAOSADATI & RINZEMA (2004) chegaram às seguintes equações para os dois parâmetros da equação Logística como uma função da temperatura e do teor de umidade:

$$\mu_m = ((a_1(T - T_{min}))^2 (1 - \exp(a_2(T - T_{max})))) \times (b_0 + b_1Y + b_2Y^2) \quad (2.9)$$

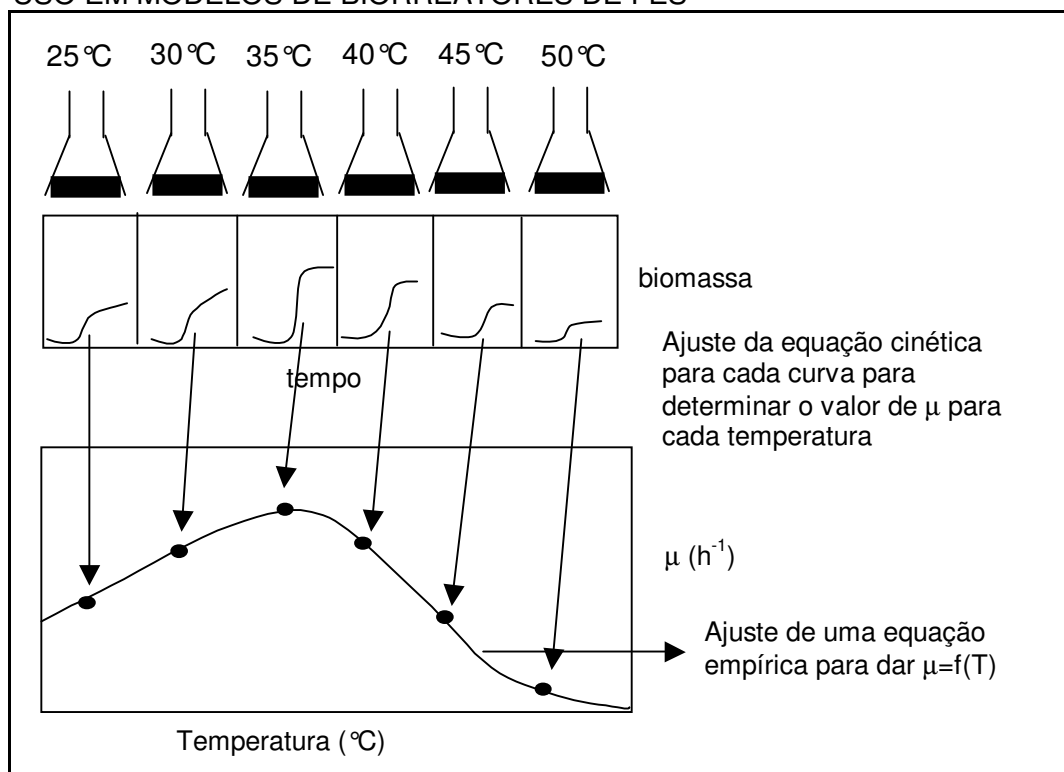
e

$$X_m = c_0 + c_1 Y + c_2 Y^2 \quad (2.10)$$

onde μ_m e X_m são a máxima velocidade específica de crescimento e a máxima biomassa possível, respectivamente; a_1 e a_2 são as constantes de correlação entre a velocidade específica de crescimento e a temperatura; b_0 , b_1 e b_2 são as constantes de correlação da velocidade específica de crescimento e o teor de água; c_0 , c_1 e c_2 são as constantes de correlação da biomassa máxima e o teor de água e T é temperatura em K. Neste estudo os autores assumiram que X_m depende apenas do teor de água, uma vez que este parâmetro se mostrou quase que independente da temperatura.

Como pode ser visto nos trabalhos relatados acima, até o momento, a modelagem do efeito da temperatura do leito sobre o crescimento do fungo tem sido feita pela aproximação em condições constantes. Neste trabalho esta aproximação é chamada de “abordagem isotérmica”. Nesta aproximação, vários cultivos são incubados em diferentes valores de temperatura, sendo que cada cultivo é mantido na mesma temperatura durante toda a fermentação. O perfil cinético é então analisado para extrair os valores dos parâmetros do modelo cinético para aquela condição em particular. Os parâmetros de crescimento são então plotados contra a temperatura e uma equação empírica é ajustada (Figura 2.4).

FIGURA 2.4 – “APROXIMAÇÃO ISOTÉRMICA” PARA DETERMINAR O EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE O CRESCIMENTO QUE TEM SIDO UTILIZADA NO DESENVOLVIMENTO DE EQUAÇÕES CINÉTICAS PARA USO EM MODELOS DE BIORREATORES DE FES



A utilização destas equações nos sub-modelos cinéticos de um modelo de biorreator traz o pressuposto implícito que o crescimento do fungo depende apenas do valor atual da temperatura, isto é, não leva em consideração o efeito do histórico da temperatura no crescimento do microrganismo. Em biorreatores de FES é muito difícil controlar a temperatura em valores ideais para o crescimento e a resposta a estas variações pode não ser aquela descrita pelas equações derivadas da abordagem isotérmica (MITCHELL, BEROVIC & KRIEGER, 2000).

IKASARI, MITCHELL & STUART (1999) mimetizaram as mudanças nos biorreatores incubando *Rhizopus oligosporus* na sua temperatura ótima de cultivo, 37°C, durante 20 horas, seguido por uma incubação a 50°C por outras 10 horas e então retornando o cultivo para 37°C. Após o retorno para 37°C, o cultivo levou 20 horas para estabilizar uma velocidade de crescimento similar àquela de um outro cultivo idêntico incubado a 37°C durante todo o ciclo de crescimento. Estes resultados sugerem que as aproximações utilizadas na modelagem devem descrever a velocidade de crescimento em qualquer instante não apenas como uma

função do valor atual da temperatura, mas também como função das temperaturas desfavoráveis vividas no passado pelo microrganismo. No contexto da FES nenhum empenho tem sido feito ou para propor tais modelos ou para realizar estudos experimentais sobre os quais tais modelos seriam baseados (MITCHELL *et al.*, 2004). Este tipo de estudo, onde a temperatura varia no tempo durante o ciclo de crescimento, mimetizando as condições enfrentadas pelo microrganismo durante um processo de FES, é chamado, aqui neste trabalho, de “abordagem não isotérmica”.

Conhecimentos sobre possíveis estratégias matemáticas podem ser conseguidos a partir de estudos feitos no contexto da microbiologia de alimentos.

BARANYI & ROBERTS (1994) introduziram um fator arbitrário para descrever o estado fisiológico das células, $Q(t)$. Este fator foi expresso como uma função das condições ambientais e a constante da velocidade específica de crescimento, dentro da equação cinética de crescimento, foi multiplicada por este fator. Este modelo foi testado por BARANYI *et al.* (1995) para prever o crescimento da bactéria *Brochothrix thermosphacta* em caldo durante regimes de temperatura do tempo dependentes, com temperatura variando entre 5°C e 25°C sob uma ampla variedade de condições onde a temperatura aumentou ou diminuiu gradualmente ou sofreu freqüentes passos de mudanças. A dinâmica de crescimento do cultivo é modelada pela equação:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \left(1 - \frac{X}{X_m}\right) \left(\frac{Q}{1 + Q}\right) \quad (2.11)$$

Uma equação diferencial pode ser desenvolvida para descrever como o estado fisiológico das células muda com o tempo e como estas mudanças são influenciadas pelas condições ambientais:

$$\frac{dQ}{dt} = f(T, a_w, Q) \quad (2.12)$$

Os autores mostraram que a velocidade específica de crescimento se adapta às mudanças na temperatura quase que imediatamente, exceto em casos extremos em que a mudança de temperatura é abrupta e próxima dos limites do

crescimento, porém seus estudos envolveram apenas baixas temperaturas, com máxima de 25 °C.

Esta mesma aproximação foi utilizada por BOVILL *et al.* (2000) para prever o crescimento das bactérias *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* em leite sob condições onde a temperatura varia, ou seja, sob condições não isotérmicas. As temperaturas de cultivo para ambas as bactérias variaram entre 5 °C e 30 °C.

Tal aproximação proposta por BARANYI & ROBERTS (1994) possibilita que as condições ambientais passadas afetem a velocidade atual de crescimento, uma vez que as condições passadas afetam o valor atual de Q . Neste modelo, a velocidade de crescimento também depende diretamente das condições ambientais atuais, cujas influências são computadas no parâmetro μ . De fato, μ é o máximo valor possível da constante da velocidade específica de crescimento sob um dado conjunto de condições ambientais, sendo que o estado fisiológico determina o quão próximo a constante da velocidade específica de crescimento atual está do valor máximo μ . No trabalho de BARANYI & ROBERTS (1994), a variável Q em nenhum momento foi definida com mais detalhes, sendo simplesmente referida como “uma quantidade adimensional relacionada ao estado fisiológico das células”, embora seja possível especular que Q possa representar um conjunto de enzimas intracelulares que desempenham um papel chave no processo de crescimento.

2.1.9. Avaliação do Estado da Literatura

A literatura conta com um número de estudos sobre a influência das variáveis ambientais, principalmente a temperatura, sobre o crescimento de microrganismos. Porém, a grande parte destes estudos é feita dentro da microbiologia de alimentos onde o enfoque da importância em se controlar a temperatura em valores ideais é completamente distinta do enfoque dado na FES, isto porque:

1. O objetivo dos microbiologistas de alimentos é minimizar ou prevenir o crescimento microbiano, em vez de otimizá-lo, como é feito na FES;
2. Na microbiologia de alimentos, a cinética da fase lag é de grande importância, enquanto que num biorreator de FES a fase de maior importância é

fase de crescimento rápido, onde ocorre uma grande geração e liberação de calor metabólico;

3. Parte dos estudos foi efetuado com bactérias ou leveduras (organismos unicelulares) e em meio líquido, o que pode tornar diferente o comportamento do microrganismo;

4. Quando o estudo é conduzido com fungos filamentosos, a velocidade de crescimento é expressa em termos de velocidade de crescimento radial de uma única colônia, o que não representa a realidade do crescimento total obtido em um biorreator de FES onde ocorre o crescimento na forma de *overculture*;

5. A maior parte das investigações é conduzida em condições isotérmicas, e as poucas que são conduzidas em condições não isotérmicas utilizam microrganismos unicelulares;

6. Quando os estudos são conduzidos em abordagem não-isotérmica, estes enfocam, na grande maioria, flutuações na temperatura abaixo da temperatura ótima para o crescimento enquanto que em FES as flutuações na temperatura acima da temperatura ótima para o crescimento são mais importantes.

Portanto, na área da FES, existe uma necessidade de, primeiramente, caracterizar os efeitos das variações de temperatura acima da ótima para crescimento e, por fim, propor uma equação cinética apropriada para descrever os efeitos destas variações.

3 OBJETIVOS

Dentro do contexto apresentado na Revisão Bibliográfica, este trabalho teve como **objetivo geral** caracterizar a influência da temperatura na cinética de crescimento do fungo *Rhizopus oryzae* em FES mediante alterações temporais desta variável ambiental, visando a obtenção de um modelo cinético empírico apropriado para a incorporação nos modelos matemáticos de desempenho de biorreatores.

Para que o objetivo acima fosse alcançado, foi necessária a realização das seguintes etapas:

1. Determinação dos efeitos que as variações temporais impostas na temperatura causam no crescimento do fungo e na produção da enzima glucoamilase;
2. Construção de um modelo matemático da cinética de crescimento de *R. oryzae* que foi exposto a variações na temperatura.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido em três laboratórios: no Laboratório de Fermentação em Estado Sólido do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular desta Universidade, no Laboratório de Tecnologia Enzimática do Departamento de Química também desta Universidade, e no Laboratório de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química da Universidade Regional de Blumenau – FURB.

Estão descritos neste capítulo os procedimentos que foram necessários para a realização de cada etapa experimental deste trabalho de doutorado. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

4.1 MICRORGANISMO UTILIZADO

O microrganismo utilizado neste trabalho foi o fungo filamentoso *Rhizopus oryzae* depositado no ATCC – American Type Culture Collection sob número 34612.

4.2 CONSERVAÇÃO DA CEPA

O fungo *Rhizopus oryzae* foi conservado sob refrigeração a 4°C em meio BDA (Batata Dextrose Agar), preparado conforme recomendação do fabricante, sendo repicado a cada dois meses. O repique foi feito em tubos de ensaio contendo o meio BDA inclinado, com a ajuda de uma alça metálica. Após o repique, os tubos de ensaio contendo os esporos foram incubados em estufa a 34°C durante 7 dias. Após este tempo os tubos foram mantidos sob refrigeração.

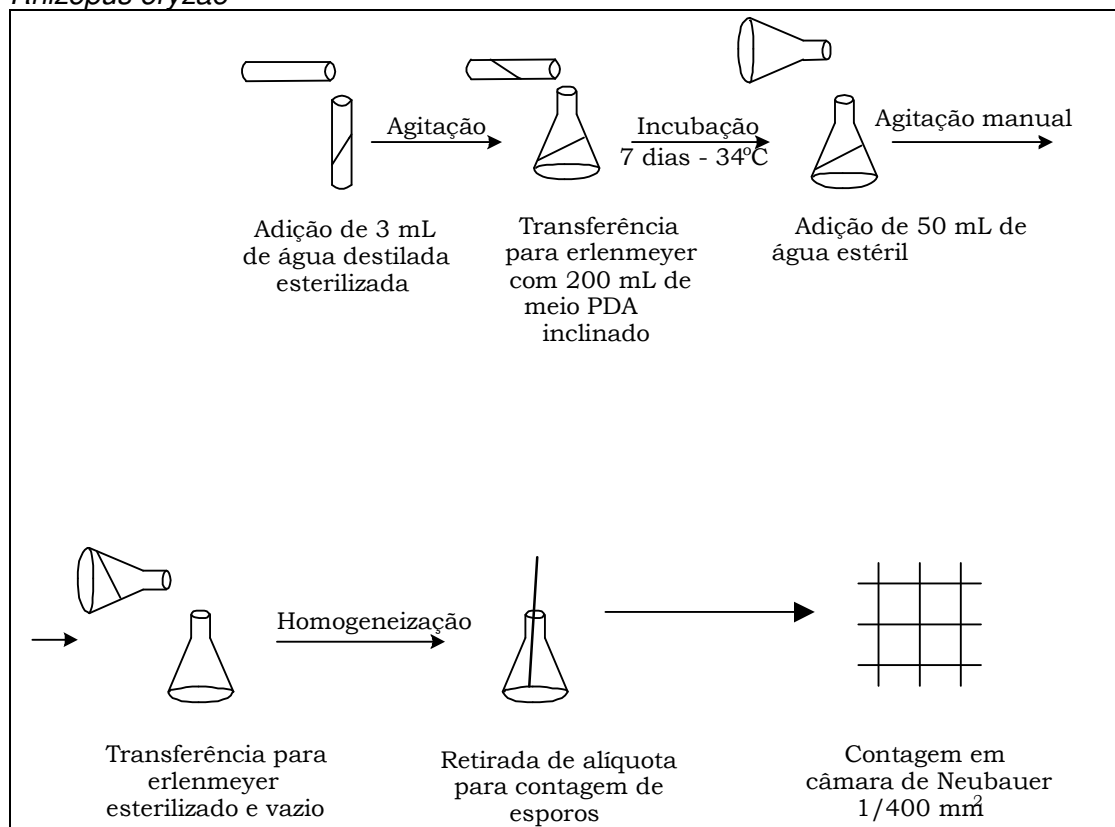
4.3 OBTENÇÃO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS

Para inocular os meios de fermentação e as placas de Petri contendo meio de cultivo à base de ágar, partiu-se de uma suspensão de esporos preparada de acordo com a metodologia descrita abaixo:

- a) Em um tubo de ensaio contendo a cultura estoque foi adicionado, assepticamente, 3 mL de água destilada estéril;
- b) O tubo foi agitado para a obtenção da suspensão dos esporos;
- c) O conteúdo do tubo foi transferido, assepticamente, para um erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL do meio BDA inclinado;
- d) O erlenmeyer foi incubado a 34°C por 7 dias para a esporulação do microrganismo sobre a superfície do meio de cultura;
- e) Após este período, foi adicionado, no erlenmeyer, 50 mL de água destilada estéril;
- f) Procedeu-se uma agitação manual por 1 minuto;
- g) O conteúdo do erlenmeyer foi colocado em um erlenmeyer vazio e estéril;
- h) Foi feita a homogeneização do conteúdo deste erlenmeyer por meio de uma agitação vigorosa e retirou-se uma alíquota desta suspensão para a contagem de esporos.

O procedimento descrito acima pode ser visualizado pelo esquema da Figura 4.1

FIGURA 4.1 - ESQUEMA DE PREPARO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS DO *Rhizopus oryzae*



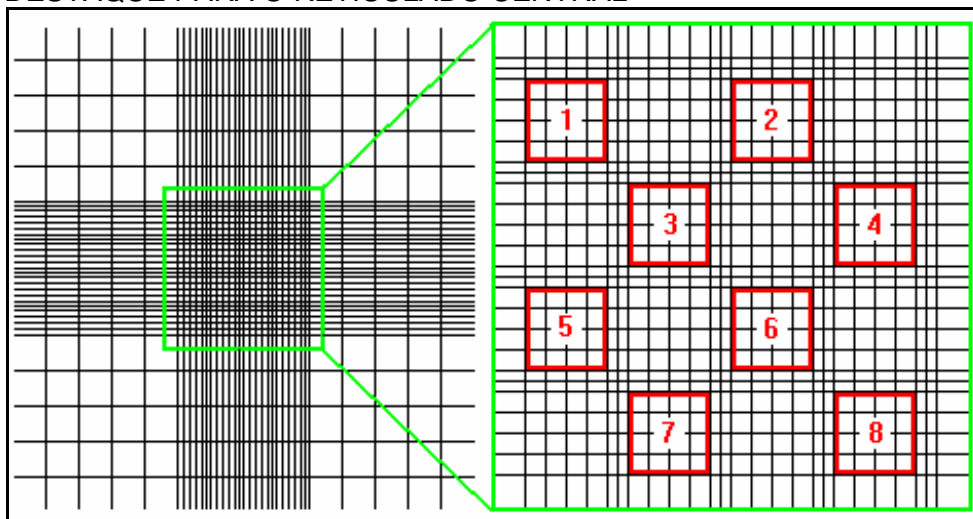
4.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ESPOROS DA SUSPENSÃO

A partir da alíquota da suspensão de esporos coletada, determinou-se sua concentração:

- A alíquota coletada foi homogeneizada com uma vigorosa agitação;
- Na câmara de Neubauer $1/400 \text{ mm}^2$, composta por dois reticulados, foi colocada a amostra homogeneizada;
- A câmara foi levada ao microscópio onde realizou-se a contagem dos esporos utilizando-se um aumento de 400 vezes (objetiva de 40 vezes e ocular de 10 vezes);
- A contagem foi realizada em 8 campos uniformemente distribuídos por um dos reticulados da câmara, como mostra a Figura 4.2;

e) A contagem foi repetida para o segundo reticulado da câmara. Assim foram contados um total de 16 campos.

FIGURA 4.2. ESQUEMA DA CÂMARA DE NEUBAUER 1/400 MM², COM DESTAQUE PARA O RETICULADO CENTRAL



Cada campo numerado da figura acima possui uma área de 1/25 mm² e é composto por 16 campos menores de 1/400 mm².

O cálculo da concentração de esporos na suspensão foi realizado de acordo com a equação 4.1.

$$C_{\text{susp}} = \frac{D_a \times \bar{N}}{V_{\text{campo}}} \quad (4.1)$$

onde:

C_{susp} = Concentração de esporos na suspensão (esporos/mL);

D_a = Fator de diluição;

\bar{N} = Número médio de esporos nos campos de 1/25 mm²;

V_{campo} = Volume de um campo de área 1/25 mm² e espessura de 0,1 mm de filme líquido = 4×10^{-6} mL.

4.5 SELEÇÃO DO MEIO DE CULTIVO A SER UTILIZADO NOS EXPERIMENTOS COM *Rhizopus oryzae*

Nesta etapa da pesquisa avaliou-se o crescimento de *R. oryzae* ATCC 34612 em placas de Petri com meios de cultivo de composição conforme a Tabela 4.1:

TABELA 4.1. COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTIVO

	Amido	(NH ₄) ₂ SO ₄	E.L.	Ouro Verde	Ágar
Meio 1	1%	0,5%	0,1%	-	2%
Meio 2	1%	0,5%	-	-	2%
Meio 3	1%	0,5%	-	0,25 mL	2%
Meio 4	3%	1%	0,1%	-	2%
Meio 5	3%	1%	-	-	2%
Meio 6	3%	1%	-	0,25 mL	2%

E.L. = Extrato de levedura

Todos os meios foram preparados em tampão fosfato pH 7, 0.1 mol/L e esterilizados em autoclave a 121 °C durante 15 minutos. O composto denominado Ouro Verde é um suplemento nutricional comercializado pela Empresa Paulista de Produtos Químicos (EPPQ Ltda.) e tem a seguinte composição:

Nitrogênio (N total):	6%
Fósforo (P ₂ O ₅):	6%
Potássio (K ₂ O solúvel)	8%
Magnésio:	0,5%
Enxofre:	0,5%
Boro:	0,03%
Zinco:	0,05%
Ferro:	0,1%
Manganês:	0,03%

Deste composto são adicionadas 0,25 mL para cada 100 mL de meio previamente esterilizado.

O crescimento de *R. oryzae* ATCC 34612 foi analisado inoculando-se as placas de Petri contendo os meios 1, 2, 3, 4, 5 e 6 (Tabela 3.1), com 0,3 mL de uma suspensão de esporos (10^7 esporos/mL), esta suspensão foi espalhada por toda a superfície do meio previamente solidificado na placa com o auxílio de uma alça de vidro esterilizada. As placas foram incubadas em estufa na temperatura de 30 °C por um período de até 7 dias.

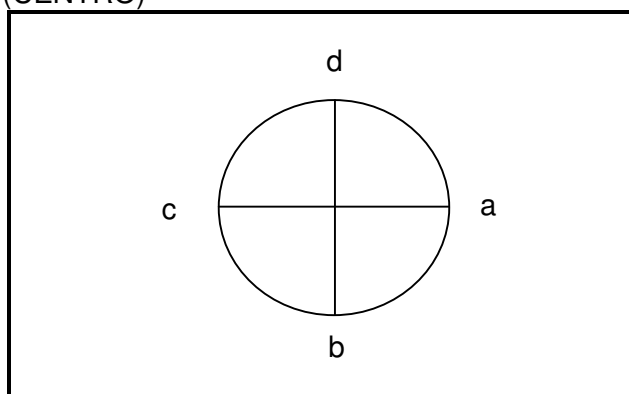
4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO ÓTIMA DO TAMPÃO FOSFATO

Para a determinação da concentração de tampão fosfato (pH 7,0) mais apropriada para o estudo da cinética de crescimento de *R. oryzae* ATCC 34612, analisou-se a velocidade de crescimento radial do microrganismo em temperatura de 30 °C.

O meio selecionado no item anterior foi feito em tampão fosfato pH 7 nas concentrações de 0,019 mol/L, 0,038 mol/L, 0,076 mol/L, 0,1143 mol/L e 0,19 mol/L. Os meios foram esterilizados em autoclave a 121 °C durante 15 minutos e distribuídos em placas de Petri.

Com o auxílio de uma alça de platina, inoculou-se o centro da placa de Petri com uma solução concentrada de esporos. A partir deste ponto traçaram-se 2 retas perpendiculares e o crescimento radial foi determinado em 4 direções: “a”, “b”, “c” e “d” (Figura 4.3).

FIGURA 4.3 - DIREÇÃO DA LEITURA DO CRESCIMENTO RADIAL DE *R. oryzae* A PARTIR DO PONTO DE INOCULAÇÃO (CENTRO)



A leitura do crescimento radial foi feita várias vezes ao dia até que o micélio alcançasse a extremidade da placa.

4.7 ESTUDO DO CRESCIMENTO RADIAL DE *R. oryzae* EM DIFERENTES TEMPERATURAS

Este estudo foi conduzido em placas de Petri contendo o meio MR cuja composição foi determinada no item 4.5 feito em tampão fosfato cuja concentração foi determinada no item 4.6. O meio MR tem, então, a seguinte composição:

3% de amido

1% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

2% de agar

0,25 mL de Ouro Verde para cada 100 mL de meio (após esterilização)

tampão fosfato pH 7 - 0,038 mol/L.

As placas foram inoculadas no centro com uma suspensão concentrada de esporos (item 4.4) com o auxílio de uma alça de platina, sendo a leitura do crescimento feita em 4 direções conforme Figura 4.3. A incubação das placas foi feita em condições isotérmicas nas seguintes temperaturas: 25 °C, 30 °C, 34 °C, 37 °C, 40 °C e 45 °C.

A medida do crescimento radial foi feita várias vezes ao dia até que o micélio alcançasse a extremidade da placa ou por um período não superior a 96 horas.

4.8 ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA SOBRE O CRESCIMENTO DE *R. oryzae* EM *OVERCULTURE* - CONDIÇÕES ISOTÉRMICAS

Este estudo foi conduzido em placas de Petri contendo o meio MR previamente esterilizado. No cultivo deste fungo em sistema *overculture* não houve a necessidade da presença de uma membrana microporosa sobre o meio. A inoculação foi feita com 0,3 mL de uma suspensão concentrada de esporos, 10^7

esporos/mL (itens 4.3 e 4.4), espalhada sobre o meio solidificado com o auxílio de uma alça de vidro estéril (*overculture*). As placas foram incubadas em estufa nas temperaturas de 30 °C, 34 °C, 37 °C e 40 °C em condições isotérmicas. Por meio desta técnica foi possível recuperar a biomassa total do microrganismo, uma vez que o mesmo pode ser retirado da superfície do meio com o auxílio de uma pinça metálica. A área total ocupada pelo microrganismo foi de 17,35 cm².

Amostras visando o acompanhamento do processo de crescimento do microrganismo por determinação da massa seca do micélio foram retiradas de tempos em tempos.

Os dados da massa seca do micélio provenientes destes estudos foram ajustados pela equação Logística:

$$X = \frac{X_{\text{máx}}}{1 + \left(\frac{X_{\text{máx}}}{X_o} - 1 \right) e^{-\mu t}} \quad (4.2)$$

onde X = biomassa
 t = tempo
 μ = velocidade específica de crescimento
 X_{máx} = biomassa máxima possível
 X_o = biomassa inicial

O ajuste foi feito por regressão não linear utilizando o programa TK Solver, subrotina NLREG que utiliza o algoritmo de Marquardt.

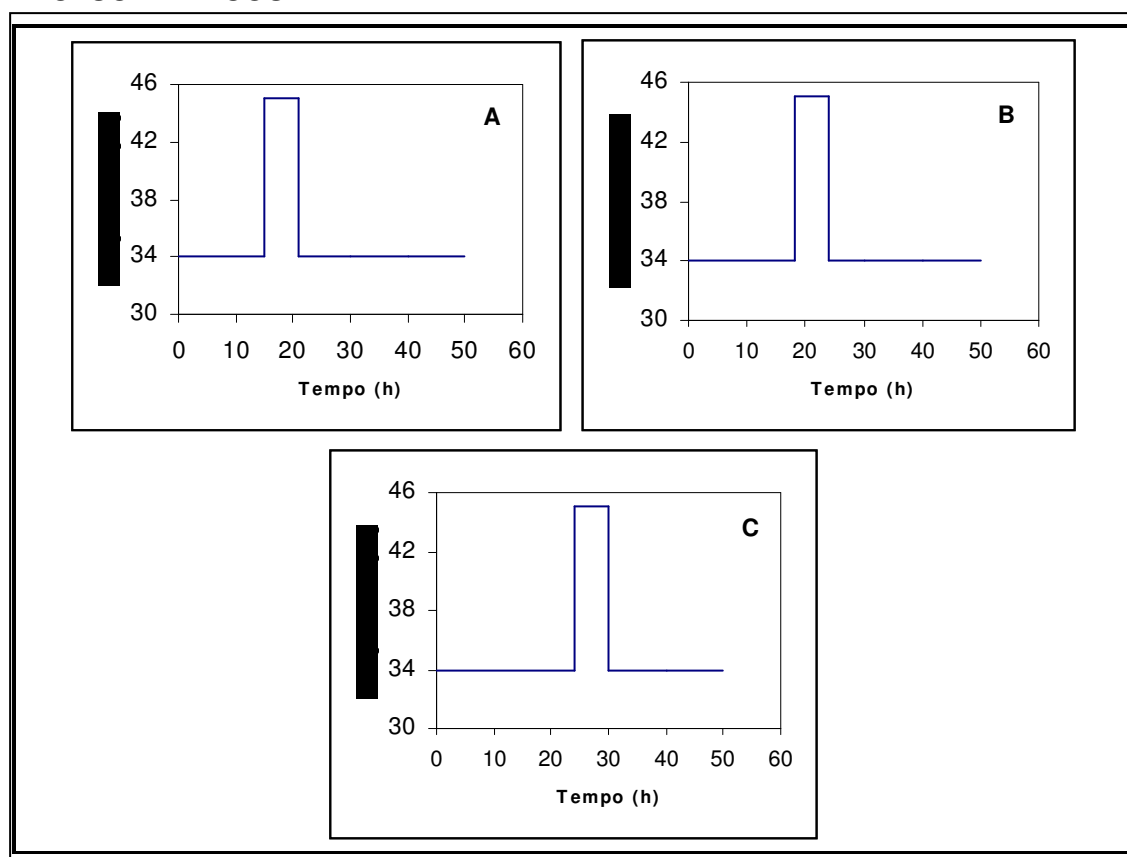
4.9 DETERMINAÇÃO DA MASSA SECA DO MICÉLIO

Após a retirada do micélio da superfície do meio, este foi seco em estufa com circulação de ar a 70 °C durante 2-5 horas até alcançar massa constante.

4.10 ESTUDO DA VARIAÇÃO DA TEMPERATURA SOBRE O CRESCIMENTO DE *R. oryzae* EM *OVERCULTURE* – CONDIÇÕES NÃO ISOTÉRMICAS.

Este estudo foi conduzido em placas de Petri contendo o meio MR previamente esterilizado. A inoculação foi feita com 0,3 mL de uma suspensão concentrada de esporos sobre o meio solidificado e espalhada com o auxílio de uma alça de vidro esterilizada (*overculture*). As placas foram incubadas em vários regimes de temperatura conforme a Figura 4.4. Placas foram coletadas em tempos previamente determinados e a massa seca do micélio nas mesmas foi determinada.

FIGURA 4.4 - ESTRATÉGIA DE INCUBAÇÃO UTILIZADA NOS EXPERIMENTOS NÃO ISOTÉRMICOS



(**A**) – NÃO ISOTÉRMICO COM AUMENTO DE T EM 15 HORAS DE CULTIVO. (**B**) - NÃO ISOTÉRMICO COM AUMENTO DE T EM 18 HORAS DE CULTIVO. (**C**) - NÃO ISOTÉRMICO COM AUMENTO DE T EM 24 HORAS DE CULTIVO

Nas 3 estratégias de incubação ilustradas na Figura 4.4, o fungo ficou exposto a uma temperatura de 45°C durante 6 horas, sendo depois colocado novamente a 34°C.

4.11 SELEÇÃO DO MEIO DE CULTIVO A SER UTILIZADO DURANTE OS EXPERIMENTOS CONDUZIDOS EM BIORREATORES DE COLUNA

Antes de realizar os estudos conduzidos nos reatores de coluna foi necessário fazer a seleção do meio a ser utilizado. Para tanto, foram testados quatro resíduos provenientes de agroindústrias, a saber:

- Farelo de trigo: proveniente da industrialização do trigo;
- Bagaço de mandioca: proveniente da produção do amido da mandioca;
- Farelo de soja: proveniente da produção do óleo de soja;
- Bagaço de malte: proveniente do uso do malte de cevada na indústria

cervejeira.

4.11.1 Preparo dos Meios para o Cultivo em Estado Sólido

A fim de se avaliar qual o melhor meio de cultivo para ser utilizado nos experimentos conduzidos em reatores de coluna foram feitos, inicialmente, experimentos com as seguintes composições de meio:

Experimento 1. Meio constituído apenas por farelo de trigo;

Experimento 2. Meio constituído com 60% de bagaço de mandioca e 40% de farelo de soja;

Experimento 3. Meio constituído com 60% de bagaço de mandioca e 40% de bagaço de malte.

O meio que levou a um rápido crescimento do microrganismo, baseado na velocidade de consumo de oxigênio, foi selecionado para estudo da influência da temperatura sobre o crescimento do fungo nos experimentos conduzidos nos reatores de coluna.

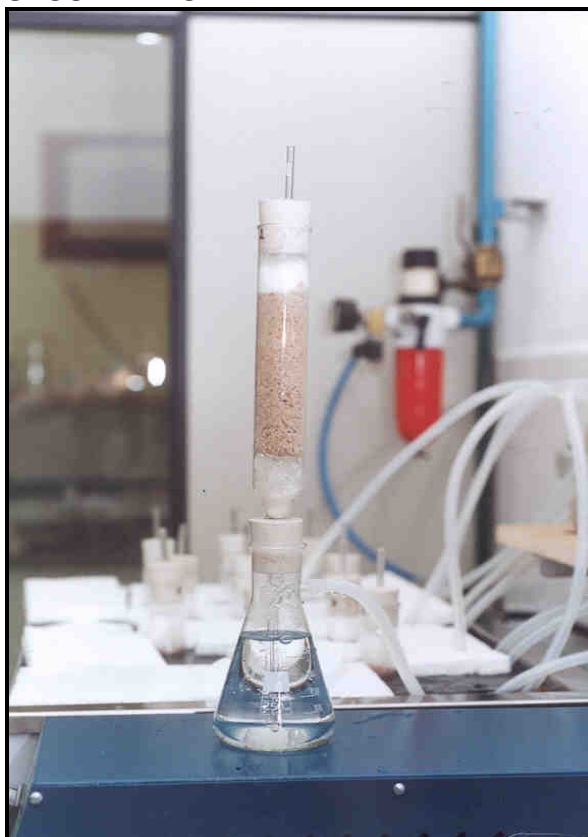
4.12 CONDIÇÕES DE CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO EM BIORREATORES DE COLUNA

4.12.1 Sistema de Biorreatores de Colunas

Todos os cultivos realizados nos biorreatores de coluna foram realizados no Laboratório de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química da Universidade Regional de Blumenau - FURB.

O sistema de biorreatores de coluna utilizado nesta pesquisa é constituído de colunas de vidro com volume útil de 80 mL o que corresponde, aproximadamente, a 20 g de meio sólido seco. A base de cada coluna é encaixada em um umidificador secundário e o topo é fechado com uma rolha de poliuretano autoclavável, perfurada por um tubo de vidro de 1,0 mm de diâmetro interno (Figura 4.5).

FIGURA 4.5 - ILUSTRAÇÃO DE UMA COLUNA PREENCHIDA COM FARELO DE TRIGO ENCAIXADA NO UMIDIFICADOR SECUNDÁRIO



O ar nas colunas foi fornecido conforme descrição abaixo:

- Um umidificador primário, construído a partir de um frasco Erlenmeyer de 1 L com 12 saídas de ar no topo, recebeu ar comprimido por um tubo de vidro com extremidade revestida por material poroso. O ar foi borbulhado em 0,5 L de água destilada, Figura 4.6.
- Este ar, já previamente umidificado, foi distribuído para as colunas pelo fundo, passando antes pelo umidificador secundário. Este umidificador secundário foi constituído de um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo aproximadamente 150 mL de água na mesma temperatura de cultivo.
- O controle da vazão de ar para cada coluna foi feito pela instalação de fluxômetros AGA, com faixa de leitura de 1 a 15 L/min, em cada saída de ar do umidificador primário. Estes fluxômetros foram posicionados sobre uma haste de metal para que fossem mantidos em posição vertical e ajustados na vazão de ar desejada. A medida que cada coluna fosse retirada do banho (FIGURA 4.9), o fluxômetro respectivo foi fechado.

FIGURA 4.6 - UMIDIFICADOR PRIMÁRIO UTILIZADO PARA A DISTRIBUIÇÃO DE AR

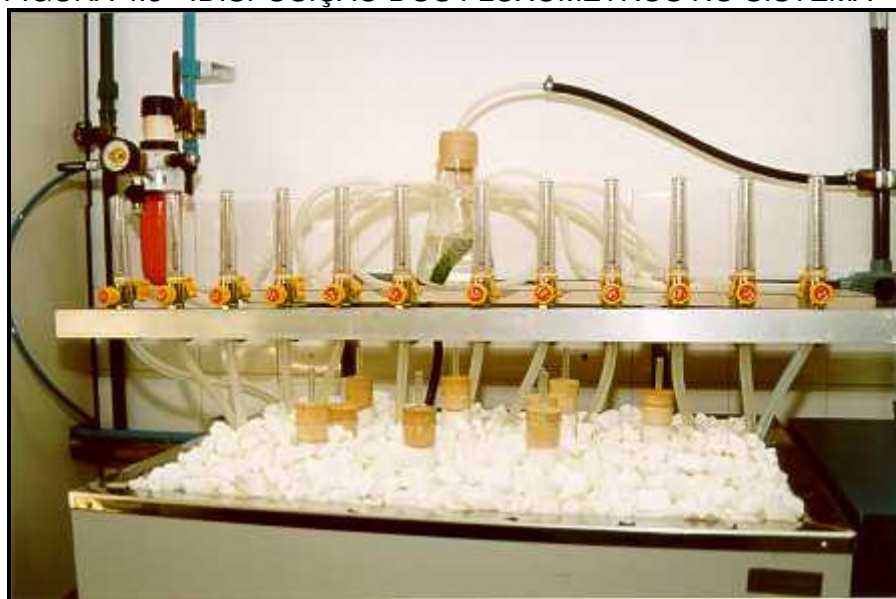


As Figuras 4.7 e 4.8 ilustram o sistema de controle de vazão do ar com a utilização dos fluxômetros.

FIGURA 4.7 - FLUXÔMETROS UTILIZADOS PARA O CONTROLE DA VAZÃO DE AR NAS COLUNAS



FIGURA 4.8 - .DISPOSIÇÃO DOS FLUXÔMETROS NO SISTEMA



Para o controle da temperatura no interior das 10 colunas que fizeram parte do sistema, estas e os umidificadores secundários foram colocados em um banho termostatzado com circulação de água construído especialmente para esta finalidade pela empresa MARCONI Ltda. nas dimensões específicas para o processo conforme ilustrado na Figura 4.9.

FIGURA 4.9 - BANHO TERMOSTÁTICO COM CIRCULAÇÃO UTILIZADO PARA O CONTROLE DA TEMPERATURA DO SISTEMA



4.12.2 Condições de Cultivo nos Biorreatores de Coluna

O meio utilizado para os cultivos nos biorreatores de coluna foi aquele em que se alcançou o crescimento mais rápido do microrganismo baseado na velocidade de consumo de oxigênio, ou seja, o meio de cultivo utilizado foi o farelo de trigo sendo as colunas preenchidas com o equivalente a 20 g de meio sólido seco.

Os meios foram, primeiramente, autoclavados por 15 minutos a 121 °C em béqueres de polipropileno fechados com papel Kraft. Em seguida foram inoculados com uma suspensão de esporos na concentração padrão de 10^7 esporos/g de meio sólido e tiveram a umidade corrigida para 70% com a adição de água destilada estéril. Os meios inoculados e umidificados foram transferidos, assepticamente, para as colunas previamente preenchidas na base com algodão, vidro picado para distribuir o ar e papel de filtro e esterilizadas em autoclave por 15 minutos a 121 °C conforme recomendado por PALMA (2003). Após o preenchimento das colunas com o meio sólido inoculado, foram colocados, na parte superior destas, papel de filtro e algodão, sendo então, fechadas e levadas ao banho termostático a 34 °C.

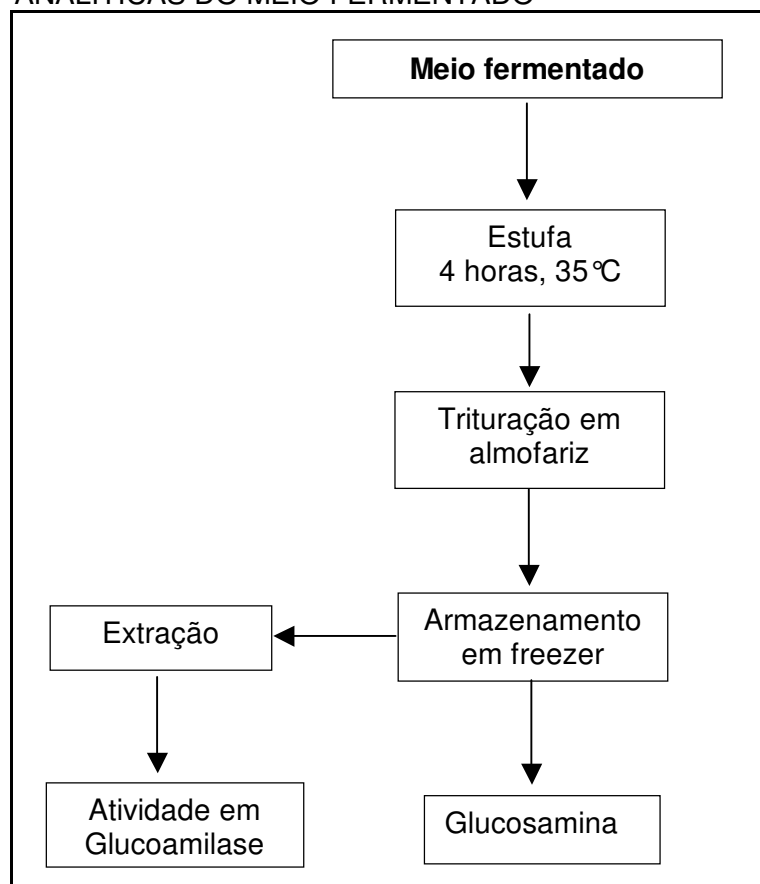
Os cultivos foram conduzidos por 50 horas sendo que em cada tempo de amostragem uma coluna foi retirada para a determinação da concentração de glucosamina, a atividade da glucoamilase e o consumo de oxigênio.

4.12.3 Tratamento das Amostras

O meio fermentado proveniente das colunas foi homogeneizado e deste material foi retirado, aproximadamente, 1 g para determinação da umidade e do pH. O restante da amostra foi transferido para um prato e levado a uma estufa com circulação de ar forçada a 35°C por 4 horas. Este procedimento teve o objetivo de parar a fermentação (MAIORANO, 1990). Após esta secagem em condições brandas, o meio seco foi transferido para um almofariz e triturado com o auxílio de um pistilo. Desta maneira, a amostra pôde ser estocada em freezer até o momento da extração para as determinações de glucosamina e atividade da glucoamilase.

A Figura 4.10 mostra a seqüência do tratamento aplicado ao meio fermentado para, então, se proceder com as análises.

FIGURA 4.10 - ESQUEMA DAS DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS DO MEIO FERMENTADO



4.13 EFEITO DA VARIAÇÃO DA TEMPERATURA SOBRE A VELOCIDADE DE CONSUMO DE OXIGÊNIO DE *Rhizopus oryzae* EM CONDIÇÕES NÃO ISOTÉRMICAS

Para este estudo o fungo *R. oryzae* foi cultivado em farelo de trigo nos biorreatores de coluna, utilizando as condições de cultivo descritas previamente. O tempo de cultivo foi de 50 horas, sendo retiradas amostras em tempos previamente determinados para quantificação do teor de glucosamina e determinação da atividade da glucoamilase. De cada amostra foi determinada a velocidade de consumo de oxigênio.

A temperatura de incubação inicial foi de 34°C sendo aumentada para 45°C em 10 horas de cultivo, permanecendo nesta temperatura durante 10 horas, retornando, então, para 34°C. Um segundo experimento foi realizado impondo um aumento de temperatura para 40°C em 10 horas de cultivo, permanecendo o fungo em 40°C também durante 10 horas, retornando, então, para 34°C. A decisão para

impor este aumento de temperatura neste tempo de cultivo (10 horas) baseou-se em experimento prévio conduzido nos biorreatores de coluna isotermicamente a 34°C. Neste experimento foi observado que o início da fase de crescimento rápido aconteceu por volta de 10 horas de cultivo e, baseando-se no fato de que em cultivos realizados em grande escala o fungo fica exposto a temperaturas elevadas durante a fase de crescimento rápido, o aumento de temperatura foi realizado neste período.

4.14 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.14.1 Extração da Enzima Glucoamilase do Meio

O método para extração da enzima do meio sólido fermentado foi adaptado daquele descrito por MAIORANO (1990), como utilizado por DALSENTER (2000) e PALMA (2003).

Em um erlenmeyer de 125 mL pesou-se 1 g de amostra em balança analítica e adicionou-se 15 mL de tampão acetato 0,02 mol/L, pH 4,2. O conjunto foi levado para um incubador rotativo a 200 rpm a 30°C durante 30 minutos, filtrando-se em seguida a suspensão em papel de filtro comum. O filtrado foi utilizado para a determinação da atividade glucoamilolítica como descrito a seguir.

4.14.2 Determinação da Atividade da Glucoamilase (E.C. 3.2.1.3. 1,4- α -D-Glican-glicohidrolase)

A determinação da atividade de glucoamilase foi realizada utilizando-se a reação da glucose-oxidase para a detecção do produto liberado (IKASARI, 1997). Para tanto adaptou-se o método utilizado por DALSENTER (2000) onde o sistema de incubação foi constituído de 5 mL de uma solução de amido 4% (MERCK) em um tubo de ensaio incubado em banho termostático a 60°C. A este tubo adicionou-se 1 mL da amostra proveniente da extração (diluída com água destilada, se necessário)

e manteve-se esta solução no banho termostático a 60°C durante 60 minutos. Decorrido este período, interrompeu-se a reação em banho de gelo e dosou-se a glucose liberada pelo método enzimático da glucose-oxidase descrito a seguir.

A atividade da enzima glucoamilase foi determinada de acordo com a seguinte equação (IKASARI, 1997):

$$Atividade(U / g) = \frac{G \times V_R}{V_A \times PM_G} \times \frac{1}{T_R} \times \frac{V_E}{M_E} \quad (4.3)$$

onde:

G = concentração da glucose pelo método da glucose-oxidase (mg.mL^{-1});

V_R = volume de meio reacional (6 mL);

V_A = volume de amostra utilizada (1 mL);

PM_G = peso molecular da glucose (180 g.mol^{-1});

T_R = tempo de reação (60 minutos);

V_E = volume do extrato (15 mL)

M_E = massa seca de amostra utilizada na extração (1 g)

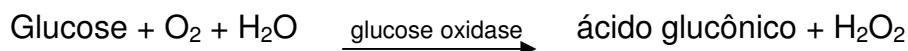
Uma unidade de atividade de glucoamilase foi definida como 1 mmol de glucose liberada por minuto.

4.14.3 Método da Glucose-Oxidase Para a Dosagem da Glucose

A dosagem da glucose das amostras foi realizada pelo método da glucose-oxidase (IKASARI, 1997). Foi empregado o reagente manufaturado pela Diasys Diagnostic Systems GmbH & Co. KG (Alemanha). Este reagente dosa a glucose pelo método enzimático "GOD-PAD".

O reagente foi assim constituído: tampão fosfato pH 7.5 (250 mmol/L), fenol (5 mmol/L), 4 – aminoantipirina (0.5 mmol/L), glucose-oxidase (GOD) ($\geq 10 \text{ KU/L}$), peroxidase (PAD) ($\geq 1 \text{ KU/L}$).

Na presença da glucose-oxidase a glucose é oxidada a ácido glucônico a peróxido de hidrogênio, segundo a seguinte reação:



O fenol e a 4 – aminoantipirina na presença de peróxido de hidrogênio e peroxidase, formam um cromógeno vermelho, 4-p-benzoquinona-monoiminoantipirina, cuja concentração é proporcional à concentração de glucose presente na amostra.

As absorbâncias foram medidas a 500 nm em espectrofotômetro. Como padrão foi utilizada glucose nas concentrações entre 0.2 g/L e 1.0 g/L.

4.14.4 Determinação do Conteúdo de Glucosamina

Na quantificação indireta do crescimento do fungo nos biorreatores de coluna, utilizou-se a dosagem da glucosamina conforme descrito por AIDOO, HENDRY & WOOD (1981): para cada 0,5 g de amostra adicionaram-se 5 mL de HCl 6N, sendo esta mistura colocada em banho de água fervente por 2 horas. Após este tempo a amostra foi resfriada e filtrada a vácuo, e, do sobrenadante, foi transferido 1 mL para um balão de 25 mL adicionando-se 1 gota de solução alcoólica de fenolftaleína 0,5% (p/v). A amostra foi neutralizada com NaOH 3 N até coloração rosa para depois, então, proceder-se a titulação reversa com KHSO₄ 1% até desaparecimento da coloração rosa. Completou-se o volume do balão com água destilada. Em 1 mL da solução contida no balão foi adicionado 1 mL de solução de acetil acetona em Na₂CO₃ 0,5 N, sendo a mistura colocada em banho de água fervente por 20 minutos e, após resfriamento, foram adicionados 6 mL de etanol e, em seguida, 1 mL de p-DAB (reagente de Erlich). A amostra foi incubada a 65°C por 10 minutos e leu-se a absorbância em espectrofotômetro a 530 nm contra um branco de água no lugar da amostra.

A curva padrão foi construída entre as concentrações de 0,01 a 0,2 g/L de glucosamina em água.

4.14.5 Correlação Entre Biomassa e Conteúdo de Glucosamina em Sistema *Overculture*

Para a obtenção dos valores de massa celular pelo método da glucosamina foi necessário estabelecer uma correlação entre esta medida e uma forma direta de determinação do crescimento celular.

Para isto foi realizado um cultivo em placas de Petri em sistema *overculture* a 34 °C conforme descrito por MITCHELL (1989). Foram determinados, para cada amostra retirada, a massa seca do micélio e o conteúdo de glucosamina desta biomassa seca.

Os valores obtidos foram submetidos à análise de regressão linear e utilizados para determinar a relação entre massa seca do fungo e conteúdo de glucosamina para posterior determinação da massa celular nos cultivos em estado sólido conduzidos nos reatores de coluna.

4.14.6 Determinação do Consumo de Oxigênio

O consumo de oxigênio foi determinado de acordo com a metodologia descrita por PALMA (2003), que teve como base o trabalho de MAIORANO *et al.* (1992) os quais por sua vez adaptaram o método proposto por SATO *et al.* (1983). A Figura 4.11 é representativa do sistema utilizado.

FIGURA 4.11 - EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO



Após a calibração do Oxímetro (Digimed modelo DM 4) o material fermentado proveniente dos reatores de coluna foi transferido para um Erlenmeyer de 250 mL onde foi encaixado o eletrodo de medida do oxigênio. Uma bomba peristáltica foi então acionada e o sistema operou em circuito fechado. Neste instante, o analisador de oxigênio foi ajustado para 100% e com o auxílio de um cronômetro, iniciaram-se as leituras feitas em intervalo de 1 minuto.

A velocidade de consumo de oxigênio durante o intervalo de consumo constante foi calculada, com base na Lei dos Gases Ideais, conforme descrito por MAIORANO *et al.* (1992):

$$\text{OUR} = \frac{(P_{\text{O}_{2i}} - P_{\text{O}_{2t}}) \cdot V}{M \cdot R \cdot T \cdot \nabla t} \quad (4.4)$$

Onde:

OUR = velocidade de consumo de oxigênio (mmol O₂/g.h)

P_{O_{2i}} = pressão parcial do oxigênio inicial (mmHg)

P_{O_{2t}} = pressão parcial do oxigênio, após o tempo de medida, em minutos (mmHg)

V = volume total do gás no sistema de medida (L) (0,327 L – variável de acordo com a massa de meio utilizada)

M = massa seca de meio fermentado (g)

R – constante universal dos gases (62,36 mmHg.L/K.mol)

T = temperatura da medida (K)

∇t = intervalo de tempo no qual é realizada a medida (min)

Entretanto, conforme PALMA (2003), devem ser feitas algumas considerações a respeito da obtenção do valor de OUR. Nestas condições, a medida é expressa em porcentagem de oxigênio, havendo necessidade de transformá-la numa medida mássica (mmol ou mg de O_2). A equação 4.4 acima converte uma medida em pressão parcial de O_2 para uma medida mássica. A $P_{O_{2i}}$ para ser inserida na equação 4.4 foi determinada por

$$P_{O_{2i}} = (P_t - P_{VH_2O}) \cdot 0,21 \quad (4.5)$$

Onde:

P_t = pressão parcial na região onde a medida foi executada, no caso, Blumenau = 760 mmHg

P_{VH_2O} = pressão de vapor da água na temperatura da medida, $34^\circ C = 39,41$ mmHg e $45^\circ C = 72$ mmHg, respectivamente.

0,21 = fração mássica de oxigênio no ar seco.

Após o cálculo, a $P_{O_{2i}}$ foi determinada como sendo de 151,32 mmHg. Este valor correspondeu a 100% de O_2 .

O valor de $P_{O_{2t}}$ em cada intervalo, também para ser inserida na equação 4.4, foi obtido pela conversão da medida em porcentagem de O_2 para uma pressão parcial em mmHg, utilizando-se uma correlação com 100% de O_2 , atribuída a $P_{O_{2i}}$.

Assim, o O_2 consumido (mmol), em cada intervalo de medida, foi obtido pela equação 4.6:

$$O_2 \text{ consumido (mmol } O_2) = \frac{(P_{O_{2i}} - P_{O_{2t}}) \cdot V}{R \cdot T} \quad (4.6)$$

A partir dos dados referentes ao consumo de O_2 (mmol), foram obtidos os valores da OUR pela equação 4.4 que, neste trabalho, foram expressos para o total da massa de bagaço fermentado, ou seja, M.OUR. Então, a M.OUR foi obtida por regressão linear entre os valores de O_2 consumidos (mmol de O_2) e tempo de medida (minuto), sendo M.OUR (mmol O_2 /min) o valor correspondente ao coeficiente angular obtido na regressão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTUDOS PRELIMINARES

A primeira etapa do trabalho refere-se à realização de experimentos para determinar as exigências nutricionais e condições de crescimento do fungo *R. oryzae*. Esta etapa foi necessária uma vez que não se tinha conhecimento destas características inerentes a esta cepa especificamente, depositada no ATCC sob número 34612.

Com a finalidade de selecionar o meio de cultivo à base de agar a ser utilizado, foram conduzidos experimentos tendo como base o crescimento radial do fungo *R. oryzae* e a quantidade da biomassa formada em termos qualitativos. A velocidade radial do crescimento das colônias foi levada em consideração na determinação de qual seria a temperatura ideal de cultivo para o fungo *R. oryzae*. Para este objetivo, o microrganismo foi cultivado em meios onde foram variáveis a concentração da solução tampão, a suplementação nutricional, a concentração da fonte de carbono (amido de mandioca comercial) e a temperatura de incubação. O seguinte critério foi utilizado para avaliar a biomassa em termos qualitativos:

+, quando o microrganismo não apresentou uma formação de biomassa aérea mas apresentou crescimento radial;

++, quando o microrganismo apresentou pouca formação de biomassa aérea com um rápido crescimento radial;

+++, quando o microrganismo apresentou razoável formação de biomassa aérea com um rápido crescimento radial;

++++, quando o microrganismo apresentou uma densa formação de biomassa aérea, também com um rápido crescimento radial;

5.1.1 Seleção do Meio de Cultivo

A Tabela 5.1 apresenta resultados de experimentos em que diferentes meios foram testados. Nestes foram utilizados tampão fosfato em pH 7 na concentração de 0,1 mol/L.

TABELA 5.1 - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS TESTADOS E AVALIAÇÃO QUALITATIVA DO CRESCIMENTO

	Amido	(NH ₄) ₂ SO ₄	E. L.	Suplementação nutricional (*)	Resultado
Meio 1	1%	0,5%	0,1%	-	+
Meio 2	1%	0,5%		-	+
Meio 3	1%	0,5%		0,25 mL/100 mL	+
Meio 4	3%	1%	0,1%	-	+++
Meio 5	3%	1%		-	++
Meio 6	3%	1%		0,25 mL/100 mL	+++

E.L. = Extrato de levedura

* = Especificada no item 4.5 do capítulo Material e Métodos

Todos os meios contiveram 2% de ágar

Os resultados qualitativos, segundo o critério adotado, estão mostrados na última coluna da Tabela 5.1. Entre os meios testados, observou-se um bom crescimento do microrganismo nos meios 4, 5 e 6. Pelo acompanhamento visual, o microrganismo cultivado no meio 5 apresentou pouca formação de hifas aéreas quando comparado aos cultivos sobre os meios 4 e 6, onde o fungo desenvolveu-se muito bem, apresentando uma razoável formação de hifas aéreas. Nos meios 1, 2 e 3 houve um lento crescimento radial sem uma nítida formação de hifas aéreas.

Considerando que os meios 4 e 6 apresentaram a mesma avaliação qualitativa, optou-se pela seleção do meio 6, uma vez que este contém como suplementação nutricional uma solução salina comercializada (Ouro Verde) cujo custo é inferior ao do extrato de levedura, que foi utilizado como suplementação nutricional no meio 4.

5.1.2 Determinação da Concentração de Tampão Fosfato

O meio anteriormente selecionado, meio 6, foi preparado com diferentes concentrações do tampão fosfato, pH 7, conforme mostrado na Tabela 5.2, onde os resultados também são apresentados de forma qualitativa.

TABELA 5.2 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO TAMPÃO FOSFATO (pH 7) SOBRE O DESENVOLVIMENTO DA CULTURA

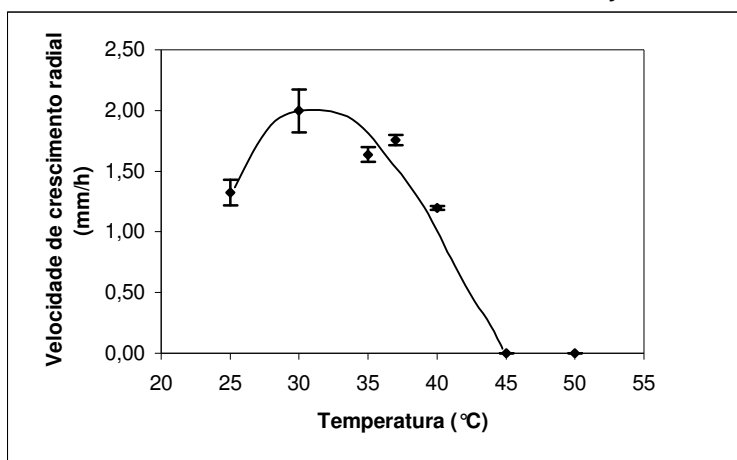
Concentração de tampão fosfato (mol/L)	Resultado
0,019	++
0,038	++++
0,076	+++
0,1143	+++
0,19	não apresentou crescimento

Diante destes resultados, o meio à base de agar para o cultivo de *R. oryzae* nos experimentos conduzidos em placas de Petri teve a seguinte composição: agar, 2%, amido de mandioca, 3%; sulfato de amônio, 1%; suplementação nutricional, 0,25 mL/100 mL; tampão fosfato pH 7, 0,038 mol/L e este meio passou a chamar-se meio MR.

5.1.3 Influência da Temperatura no Crescimento Radial

Com a finalidade de avaliar a influência da temperatura sobre o crescimento de *R. oryzae*, cultivou-se o fungo em várias temperaturas, porém constantes durante todo o ciclo de crescimento. O parâmetro da análise foi medido pelo seu crescimento radial. A Figura 5.1 mostra o comportamento da velocidade do crescimento radial do fungo no intervalo de 25 °C a 50 °C.

FIGURA 5.1 - INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA SOBRE O CRESCIMENTO RADIAL DE *R. oryzae*



Pelo gráfico representado na Figura 5.1, nota-se a nítida influência da temperatura sobre a velocidade de crescimento radial do fungo *R. oryzae*. Na temperatura de 30°C o fungo apresentou a maior velocidade de crescimento radial, 2 mm/h, e em temperaturas maiores ou menores que esta pode-se observar uma diminuição gradativa desta velocidade. Na temperatura de 45°C o microrganismo não apresentou nenhum crescimento, indicando que esta temperatura é inadequada. Este estudo permitiu a seleção de temperaturas a serem utilizadas nos estudos subseqüentes onde a influência da temperatura sobre o crescimento foi avaliada em condições isotérmicas.

5.1.4 Influência da Temperatura Sobre o Crescimento de *R. oryzae* em Sistema *Overculture*

Com a finalidade de avaliar o comportamento do microrganismo *Rhizopus oryzae* em relação a sua velocidade de crescimento em diversas temperaturas sob condições isotérmicas foi utilizado o sistema *overculture*. Para isto, o fungo foi incubado em temperaturas previamente determinadas tendo como base o intervalo de temperatura que promoveu uma velocidade de crescimento radial superior a 1 mm/h (Figura 5.1 do item 5.1.3). As amostras de biomassa foram retiradas em intervalos regulares de tempo. A equação Logística (eq. 4.2, pág. 46) foi então

ajustada aos dados de biomassa seca e a Tabela 5.3 mostra os valores da constante da velocidade específica de crescimento, μ , e da biomassa máxima, X_{\max} .

TABELA 5.3 VALORES DE μ E X_{\max} ESTIMADOS PARA CADA TEMPERATURA PELO AJUSTE DA EQUAÇÃO LOGÍSTICA AOS DADOS EXPERIMENTAIS

Temperatura (°C)	μ (h ⁻¹)	X_{\max} (mg/cm ²)
30	0,149	3,34
34	0,263	3,02
37	0,196	2,65
40	0,204	2,37

Pode-se observar que, a exemplo do que ocorre na velocidade de crescimento radial, a temperatura também exerce uma influência na constante da velocidade específica de crescimento (μ) do microrganismo quando cultivado em *overculture*. A 34 °C, onde a constante da velocidade específica de crescimento foi de 0,263 h⁻¹, a máxima biomassa prevista pela equação Logística, X_{\max} , foi de 3,02 mg/cm². Apesar da equação Logística prever um X_{\max} maior para a temperatura de 30 °C, 3,34 mg/cm², pode-se observar na Figura 5.2 que pelos dados experimentais não existe diferença entre os valores de X_{\max} quando o fungo é cultivado em 30 °C ou 34 °C. Então, pode-se propor que esta diferença no valor de X_{\max} prevista pelo modelo é um artefato do ajuste da equação aos dados experimentais.

O ajuste da Equação Logística aos dados da biomassa seca está mostrado na Figura 5.2. A biomassa é expressa em mg/cm². A coleta de dados da biomassa seca em tempos anteriores aos aqui mostrados é praticamente impossível de se fazer neste sistema.

FIGURA 5.2 - PERFIL DO AJUSTE DA EQUAÇÃO LOGÍSTICA AOS DADOS DE BIOMASSA SECA (mg/cm^2), EM FUNÇÃO DO TEMPO (h)

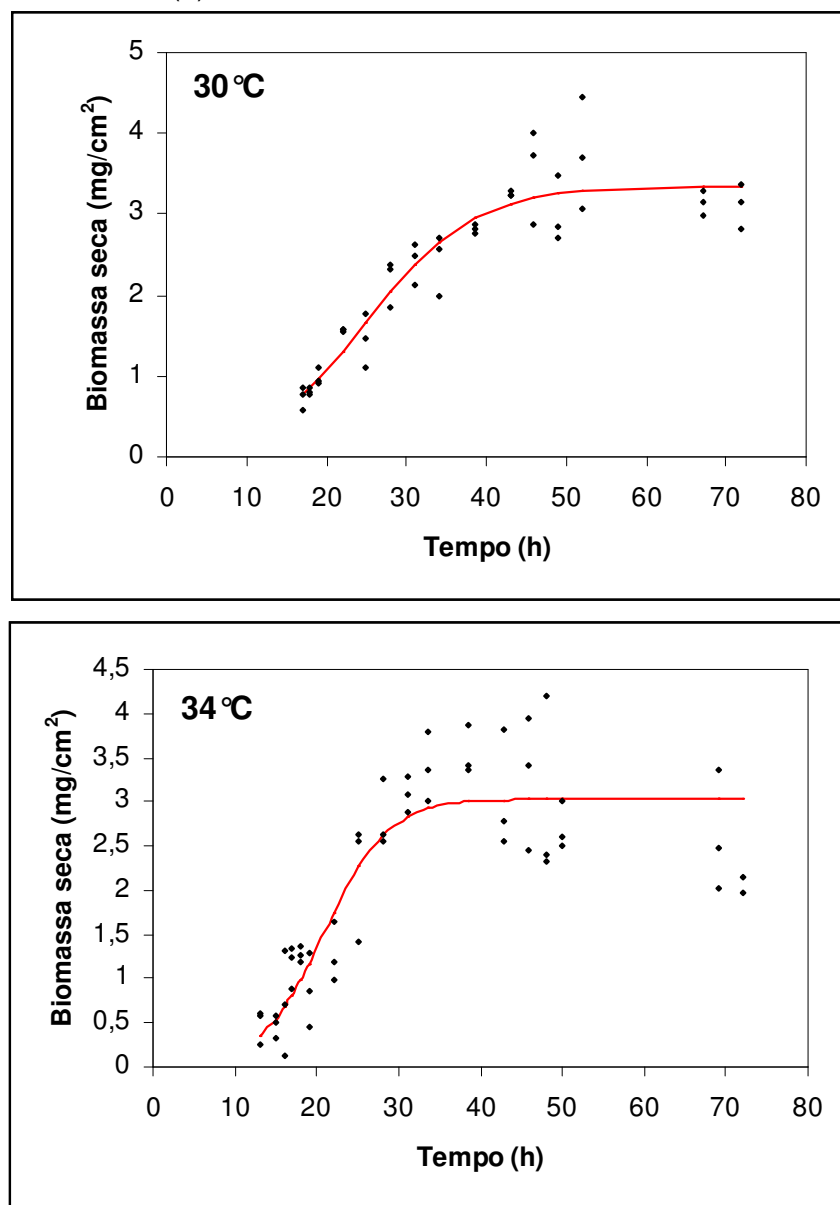
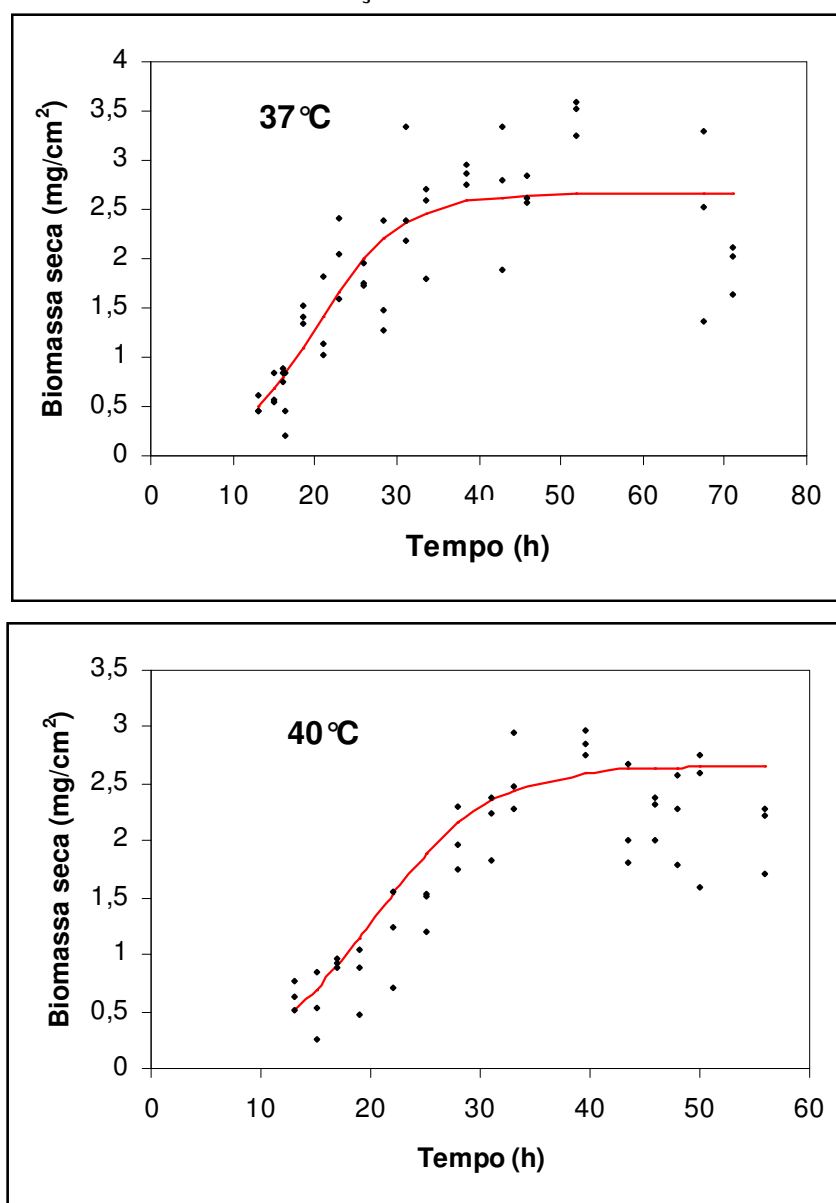


FIGURA 5.2 - CONTINUAÇÃO



Diante destes resultados, estabeleceu-se como ideal para o cultivo de *R. oryzae* no meio MR a temperatura de 34°C. Esta temperatura não é surpreendente, pois vários trabalhos encontrados na literatura com cepas deste gênero utilizaram uma temperatura na faixa dos 30°C até 37°C, como mostra a Tabela 5.4.

TABELA 5.4- FAIXA DE TEMPERATURA UTILIZADA PARA O CULTIVO DE FUNGOS DO GÊNERO *Rhizopus*

Autor	Cepa	Temperatura de cultivo (°C)
AIKAT & BHATTACHARYYA (2000)	<i>R. oryzae</i> NRRL 21498	30 °C
BRAMORSKI <i>et al.</i> (1998 a)	<i>R. oryzae</i> ATCC 34612	30 °C
BRAND <i>et al.</i> (2000)	<i>R. arrhizus</i> LPB-79	32 °C
IKASARI & MITCHELL (2000) NOPHARATANA, MITCHELL & HOWES. (2003)	<i>R. oligosporus</i> ACM 4668	37 °C
STERTZ <i>et al.</i> (1999)	<i>R. formosa</i> MUCL 28422	32 °C

Estes experimentos foram importantes porque proporcionaram um conhecimento de qual é a temperatura ótima de cultivo de *R. oryzae* e uma noção do quanto uma temperatura superior à ótima pode influenciar o seu crescimento. A literatura é ampla em estudos, feitos pela abordagem isotérmica, que mostram que as variáveis ambientais, principalmente a temperatura e a atividade de água, influenciam as atividades microbianas, principalmente o seu crescimento e a produção de enzimas. Entretanto, a maioria dos estudos sobre a influência da temperatura sobre a atividade microbiana é voltado à microbiologia de alimentos, e enfoca a influência desta variável ambiental sobre a fase lag de crescimento, já que nesta área o crescimento dos microrganismos é totalmente indesejável. Na área voltada à FES, que pela própria característica do processo faz com que o microrganismo vivencie experiências não isotérmicas durante a fermentação, os estudos são mais escassos e o presente trabalho visa promover um conhecimento de como o aumento da temperatura durante o ciclo de crescimento pode influenciar o crescimento e a produção da enzima glucoamilase, utilizando como modelo o fungo filamentoso *Rhizopus oryzae*. Para isto, estudou-se o comportamento da cinética de crescimento do fungo e da produção da enzima, em sistema de biorreator

de colunas, em condições de cultivo isotérmico e não isotérmico. Os resultados estão apresentados e discutidos na seção seguinte.

5.2 CULTIVO EM BIORREATORES DE COLUNA

Primeiramente fez-se a seleção de qual meio seria utilizado nos experimentos conduzidos nos biorreatores de coluna. Esta seleção foi feita mediante o cultivo do fungo nos biorreatores em temperatura constante de 34 °C (item 5.1.4).

Uma vez conhecido o melhor meio para o cultivo de *R. oryzae* neste sistema de biorreatores de coluna, realizaram-se experimentos em abordagem isotérmica a 34 °C, e em abordagem não isotérmica, onde a temperatura de cultivo iniciada em 34 °C foi elevada para 45 °C (ou 40 °C). Este procedimento mimetizou os aumentos de temperatura que acontecem durante a FES, principal problema associado ao *scale up* deste processo (NAGEL *et al.*, 2001). Para mimetizar a fase de esfriamento, isto é, o período de metabolismo lento e diminuição de temperatura, a temperatura do cultivo retornou para 34 °C. A temperatura de 45 °C foi escolhida baseada nos aumentos de temperatura que ocorreram em biorreatores de coluna obtidos por GHILDYAL *et al.* (1994) e também nos relatos de LU, LI & WU (2003) que observaram um aumento de até 15 °C na temperatura durante o cultivo de *A. sulphureus* em biorreator de bandeja. A temperatura de 40 °C foi escolhida baseada no seguinte raciocínio: (1) sabe-se que os aumentos de temperatura acontecem durante um processo de FES e eles são indesejáveis; (2) é preciso evitar que estes aumentos alcancem valores que possam comprometer o crescimento do fungo e, conseqüentemente, comprometer a produção do metabólito desejável; (3) é necessário saber até onde a temperatura pode subir a ponto de não comprometer o processo; (4) se 45 °C é uma temperatura alta demais, será que, se conseguir controlar o aumento da temperatura para até 40 °C, o fungo continuaria a crescer e a produzir a enzima? Se sim, pode-se deixar o leito alcançar este valor durante o processo. Por outro lado, se 40 °C for alto demais, é sabido que deve-se tomar as providências para que a temperatura do leito nem chegue a este valor.

Com a intenção de se avaliar o crescimento do fungo e a influência da temperatura sobre a cinética de crescimento celular, avaliou-se a biomassa em

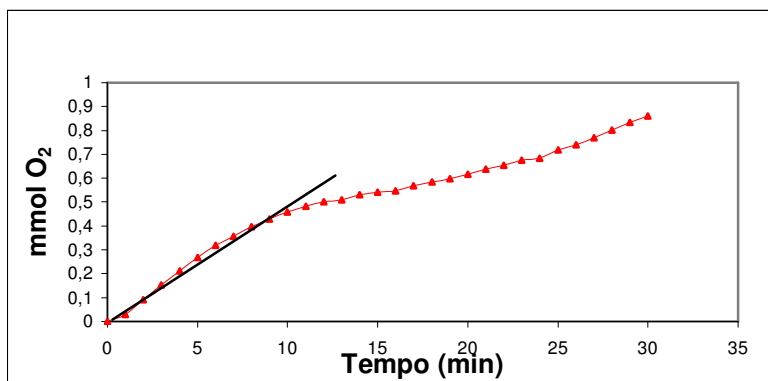
termos de glucosamina, componente da quitina presente na parede celular dos fungos que pode ser um indicativo do seu crescimento. Isto foi necessário devido à impossibilidade de se medir diretamente a biomassa em sistemas de FES que envolvem fungos (item 2.1.3.5).

5.2.1 Seleção do Meio de Cultivo

O consumo de oxigênio durante o metabolismo dos fungos aeróbios está associado ao crescimento celular e pode ser utilizado para acompanhar o crescimento de maneira indireta nos cultivos em estado sólido. A medida do consumo de oxigênio é simples e rápida e pode ser feita diretamente do meio sólido por um oxímetro ou cromatógrafo gasoso (DESGRANGES *et al.*, 1991; LEHKA & LONSANE, 1994).

O método proposto por SATO *et al.* (1983) para medir a velocidade do consumo de oxigênio, adaptado por MAIORANO *et al.* (1992) e utilizado por PALMA (2003), foi também utilizado nesta pesquisa para se calcular a velocidade de consumo de oxigênio das amostras provenientes dos biorreatores de coluna. Com a finalidade de se determinar o intervalo de tempo em que seria feita a medida, a velocidade de consumo de oxigênio de amostras provenientes de cultivo isotérmico a 34°C de *R. oryzae* em farelo de trigo foram avaliadas quanto ao consumo de oxigênio em intervalos regulares de tempo, durante 30 minutos. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 5.3.

FIGURA 5.3 CONSUMO DE OXIGÊNIO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE MEDIDA



Pode-se observar que ocorre um desvio da linearidade após 10 minutos de medida, com um consumo acumulado de 0,46 mmol. Portanto, o tempo de 10 minutos não deve ser ultrapassado ao se aplicar o método em questão. Observa-se ainda que o desvio da linearidade acontece quando já foi consumido cerca de 53% do oxigênio presente no sistema de medida. Mesmo após este ponto, a velocidade de respiração ainda se apresentava bastante intensa. O desvio da linearidade apontado pode ser conseqüência do acúmulo de CO₂ no sistema de medida ou devido à limitação na transferência de oxigênio. Ou seja, com o consumo de oxigênio pelo fungo e a conseqüente queda de pressão parcial do oxigênio (o sistema de medição é fechado), fica cada vez mais difícil do oxigênio ser transferido para a película líquida que envolve as partículas sólidas, dificultando a respiração do fungo, devido às limitações na transferência de gases que são características do processo de FES. Uma segunda possibilidade é que a quantidade de micélio ativo no frasco de amostragem pode estar diminuindo uma vez que todo o conteúdo proveniente de uma coluna foi homogeneizado antes de ser colocado no frasco de medida do consumo de oxigênio. Esta homogeneização pode ter danificado o micélio.

Este procedimento foi repetido para cada amostra (coluna) ao longo de um ensaio de fermentação no estado sólido, sendo que a medida do oxigênio consumido foi feita de minuto em minuto em cada amostra (coluna) retirada do ensaio fermentativo.

As equações obtidas por regressão linear dos dados de oxigênio consumido versus tempo de medida para as amostras provenientes de um ensaio fermentativo de *R. oryzae* cultivado em farelo de trigo a 34 °C são mostradas na Tabela 5.5. As

boas correlações obtidas permitiram que se padronizasse o intervalo de tempo de medida do oxigênio consumido em 10 minutos.

Tabela 5.5 Ajuste dos valores de consumo de oxigênio (y) com o tempo de medida (x) para os primeiros 10 minutos de monitoramento de amostras que foram retiradas do sistema de incubação em tempos de fermentação diferentes

Tempo de fermentação (h)	Equação	R
4	$y = 0,0236x - 0,0055$	0,9946
7	$y = 0,0337x - 0,0003$	0,9920
10	$y = 0,0503x - 0,0006$	0,9916
13	$y = 0,05067x - 0,0056$	0,9967
16	$y = 0,1265x - 0,0204$	0,9913
19,5	$y = 0,0838x - 0,0152$	0,9915
24	$y = 0,0531x + 0,0009$	0,9937
30	$y = 0,0409x + 0,0029$	0,9975
48	$y = 0,049x + 0,0014$	0,9979
53	$y = 0,0488x - 0,0017$	0,9994

As boas correlações lineares obtidas também permitem determinar os coeficientes angulares das retas, ou seja, o valor da velocidade de respiração da massa total existente no recipiente de medida (M.OUR em mmol/min, onde M = massa de material no recipiente de medida (g) e OUR = valor de respiração em mmol/g.min).

Uma vez estabelecido o procedimento de medida e o cálculo de M.OUR, pôde-se selecionar o meio de cultivo a ser utilizado na avaliação da influência do aumento de temperatura durante o ciclo de crescimento de *R. oryzae* cultivado em biorreator de coluna.

As velocidades de consumo de oxigênio máximas alcançadas pelo microrganismo *R. oryzae* quando cultivado nos meios testados são mostradas na Tabela 5.6.

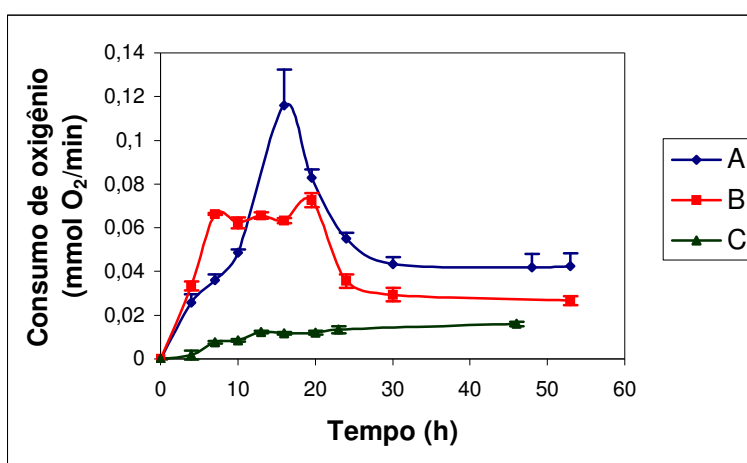
TABELA 5.6. VELOCIDADE MÁXIMA DE CONSUMO DE O₂ ALCANÇADA NOS DIFERENTES MEIOS TESTADOS

Meio	Composição do meio	Proporção	M.OUR máxima (mmol O ₂ /min)
A	Farelo de trigo	-	0,13
B	Bagaço de mandioca/farelo de soja	6:4	0,075
C	Bagaço de mandioca/bagaço de malte	6:4	0,012

A proporção utilizada para o preparo dos meios B e C teve a intenção de utilizar mais de 50% de bagaço de mandioca porque este é um resíduo proveniente da industrialização da mandioca e é muito abundante na região do Alto Vale do Itajaí em Santa Catarina (Dalsenter, 2000) e também na região oeste do Estado do Paraná (Bramorski, 1997).

A Figura 5.4 mostra o perfil cinético de cada um dos três meios testados.

FIGURA 5.4 - PADRÕES CINÉTICOS DA M.OUR DURANTE FES DOS TRÊS MEIOS TESTADOS



A – farelo de trigo

B – bagaço de mandioca/farelo de soja (6:4)

C – bagaço de mandioca/bagaço de malte (6:4)

Os resultados mostram uma mais alta M.OUR no cultivo de *R. oryzae* no meio A, constituído de 100% farelo de trigo. Este valor corresponde a uma M.OUR 2 vezes maior que aquela alcançada com o meio B e 10 vezes maior daquela alcançada com o meio C. Deste resultados, selecionou-se o farelo de trigo como

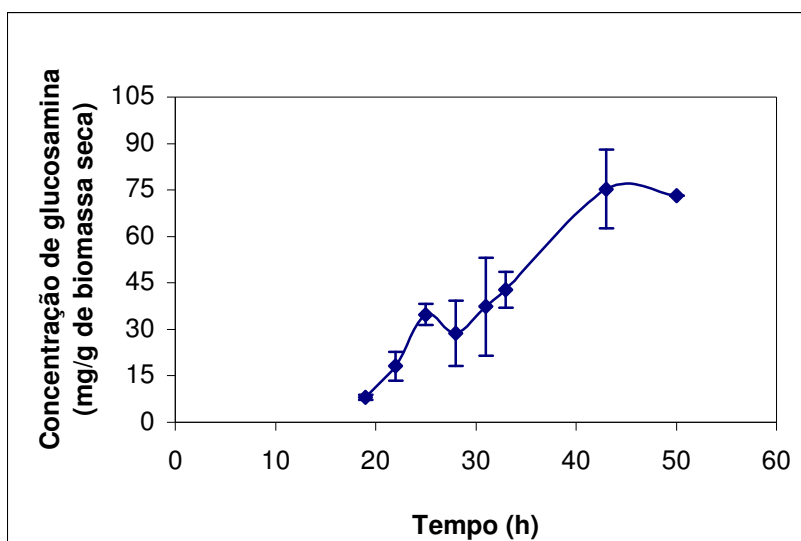
meio de cultivo de *R. oryzae* no sistema de biorreatores em coluna para investigação do efeito da variação da temperatura sobre a velocidade de consumo de oxigênio e sobre a produção da enzima glucoamilase.

5.2.2 DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA NOS CULTIVOS EM BIORREATORES DE COLUNA

Para a avaliação da biomassa nos cultivos em biorreatores de coluna utilizou-se a medida do conteúdo de glucosamina do micélio. Anteriormente, porém, estabeleceu-se um procedimento de calibração que consiste na determinação da razão do teor de glucosamina por massa seca do micélio, o que deve ser padronizado num sistema no qual é possível medir esta massa seca. Isto pode ser feito pelo cultivo do microrganismo em cultura líquida ou num sistema de cultivo em placas que permita a total recuperação da biomassa. Neste trabalho optou-se pelo cultivo em placas em sistema *overculture* (IKASARI & MITCHELL, 2000), uma vez que o fator de conversão entre glucosamina e biomassa pode variar com o ambiente de crescimento (NOPHARATANA, MITCHELL & HOWES 2003).

O fator de conversão entre glucosamina e biomassa varia com a idade para muitos fungos, e isto também foi mostrado neste trabalho (Figura 5.5).

FIGURA 5.5 EVOLUÇÃO DO CONTEÚDO DE GLUCOSAMINA AO LONGO DO TEMPO DE CULTIVO DE *R. oryzae* CULTIVADO EM SISTEMA OVERCULTURE A 34°C

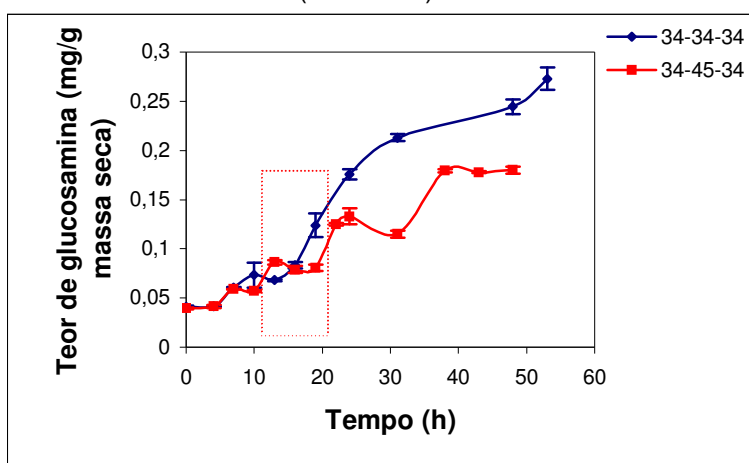


Verifica-se que o teor de glucosamina aumentou durante todo o tempo de cultivo. Este aumento no teor de glucosamina está de acordo, por exemplo, com os resultados de RIDE & DRYSDALE (1972) para o cultivo de *Mycosphaerella pinodes*, DESGRANGES *et al.* (1991) para o cultivo de *Beauveria bassiana*, OOIKAAS *et al.* (1998) para o cultivo de *Coniothyrium minitans*, GELMI *et al.* (2000) para o cultivo de *Gibberella fujikuroi* e NOPHARATANA, MITCHELL & HOWES (2003) para o cultivo de *Rhizopus oligosporus* e difere daqueles alcançados por ROCHE & DURAND (1996) e PALMA (2003) para o cultivo de *Thermoascus aurantiacus* onde o teor de glucosamina foi constante no fungo ao longo do tempo. Este aumento é causado, provavelmente, pela resistência da quitina (polímero do qual a glucosamina é a unidade monomérica) aos danos após a morte do fungo, sendo que a quitina pode permanecer nas hifas “fantasmas” vazias (OOIKJAAS, TRAMPER & BUITELAAR, 1998). Esta grande variação do teor de glucosamina durante o crescimento de *R. oryzae* tornou problemática a conversão da medida da glucosamina em concentração de biomassa. Então, não se fez a conversão da medida da glucosamina em concentração de biomassa nas amostras provenientes dos biorreatores de coluna, impossibilitando a determinação dos parâmetros cinéticos como a velocidade específica de consumo de oxigênio ao longo do tempo, Q_{O_2} ; o

fator de conversão oxigênio em célula, Y_{X/O_2} ; e o coeficiente de manutenção celular, m_O ; provenientes destes cultivos.

A Figura 5.6 ilustra o perfil da concentração da glucosamina ao longo do tempo de cultivo das fermentações conduzidas em biorreatores de coluna em condições isotérmicas (34-34-34) e não isotérmicas (34-45-34), itens 4.12 e 4.13. Em condições não isotérmicas, o valor máximo de glucosamina alcançado foi em torno de 0,180 mg/g de biomassa seca, enquanto que em cultivo isotérmico o teor de glucosamina chegou a 0,286 mg/g de biomassa seca.

FIGURA 5.6 - PERFIL DA CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSAMINA NAS AMOSTRAS PROVENIENTES DO CULTIVO DE *R. oryzae* EM BIORREACTORES DE COLUNA EM CONDIÇÕES ISOTÉRMICAS (34-34-34) E NÃO ISOTÉRMICAS (34-45-34).



A CAIXA REPRESENTA O INTERVALO DE AUMENTO DE TEMPERATURA PARA O CULTIVO NÃO ISOTÉRMICO

Como o teor de glucosamina no fungo não é constante (Figura 5.5), ou seja, ele varia com a idade do microrganismo, não se pode afirmar se o efeito da temperatura é sobre o crescimento (com a biomassa tendo a mesma relação glucosamina/biomassa) ou sobre a razão glucosamina/biomassa.

Mesmo não sendo possível interpretar o efeito de temperatura no crescimento propriamente dito, utilizando estes resultados obtidos para a glucosamina, é possível dizer que o efeito deletério de temperaturas elevadas se reflete no perfil da glucosamina que então poderia ser utilizado para monitorar a cultivo em situações onde a determinação da velocidade de consumo de oxigênio

seria impossível de se realizar. De todo o modo, optou-se por utilizar a medida da velocidade de consumo de oxigênio para monitorar os cultivos posteriores uma vez que esta medida proporciona informações sobre a atividade metabólica das células.

5.2.3 Efeito da Variação da Temperatura no Cultivo de *Rhizopus oryzae* em Condições Não-Isotérmicas Monitorado pelo Consumo de O₂

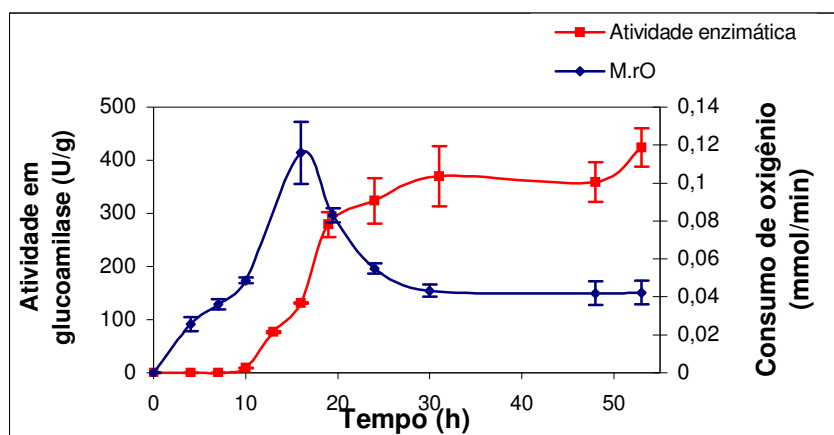
O efeito da alteração da temperatura durante o ciclo de crescimento do fungo foi avaliado medindo-se o consumo de oxigênio e a produção da enzima glucoamilase.

Pelo perfil cinético mostrado na Figura 5.7, referente ao consumo de oxigênio proveniente dos cultivos realizados em abordagem isotérmica a 34 °C (linha azul), pode-se observar que em 16 horas de cultivo o fungo alcançou a máxima velocidade de consumo de oxigênio, 0,13 mmol de O₂/min. A velocidade de consumo de oxigênio aumenta rapidamente desde o início e a partir de 10 horas de cultivo, início da fase de crescimento rápido, a velocidade de consumo aumenta mais rapidamente ainda. Após 16 horas de cultivo, esta velocidade diminui até às 30 h, mantendo-se constante depois em 0,04 mmol de O₂/min.

O início da produção de glucoamilase pelo fungo coincide com o aumento na velocidade de consumo de oxigênio em 10 horas de cultivo. A atividade da enzima aumenta rapidamente no mesmo intervalo de tempo em que a velocidade de consumo de oxigênio também aumenta rapidamente, ficando a atividade da enzima estável a partir de 24 horas de cultivo (Figura 5.7), mesmo tempo em que a respiração do fungo começa a alcançar o patamar que indica um consumo de oxigênio requerido para manutenção celular. Estes resultados sugerem que o consumo de oxigênio acompanha a produção enzimática na fase de mais rápido consumo de oxigênio, ou seja, na fase de rápido crescimento celular.

Portanto, decidiu-se impor o aumento da temperatura a partir das 10 horas de cultivo, tempo que inicia a fase de crescimento rápido e alta velocidade de consumo de oxigênio, o que provocaria uma grande geração de calor metabólico num biorreator de grande escala. O microrganismo ficou exposto nestas temperaturas durante um período de 10 horas, retornando, então, para 34 °C.

FIGURA 5.7 - CONSUMO DE OXIGÊNIO E ATIVIDADE DE GLUCOAMILASE DE *R. oryzae* CULTIVADO EM FARELO DE TRIGO ISOTERMICAMENTE A 34°C

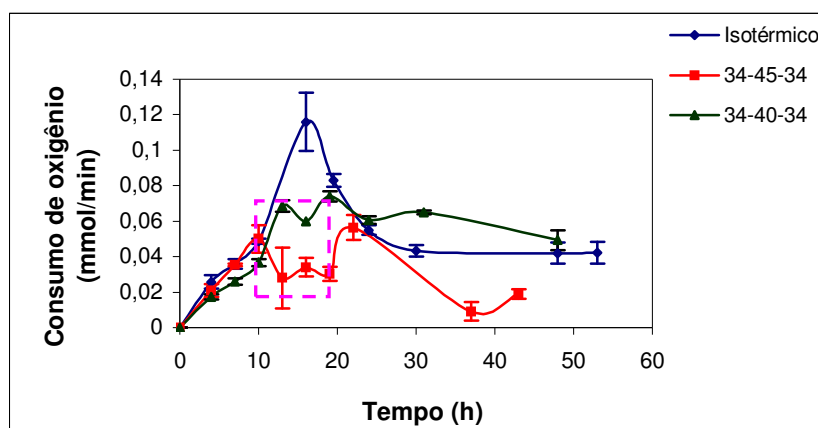


O comportamento da velocidade de consumo de oxigênio (M.OUR) do fungo *R. oryzae* frente ao aumento de temperatura durante o ciclo de crescimento está ilustrado na Figura 5.8 juntamente com o perfil da velocidade de consumo durante cultivo isotérmico a 34°C. Em condições de cultivo não isotérmico, a velocidade de consumo de oxigênio é nitidamente mais baixa a partir de 10 horas de cultivo tanto para o aumento da temperatura para 40°C quanto para o aumento da temperatura para 45°C, quando comparado àquele apresentado pelo fungo quando cultivado isotermicamente a 34°C. A M.OUR alcançada pelo fungo exposto a um aumento na temperatura para 45°C foi 47% do valor da M.OUR atingida quando o cultivo foi isotérmico a 34°C e 60% daquele valor quando o aumento da temperatura foi para 40°C.

A partir de 13 horas de cultivo, isto é, 3 horas após o aumento da temperatura para 45°C, já se percebe a queda na velocidade de consumo de oxigênio. Isto sugere que o fungo apresenta uma resposta imediata ao estresse causado pela elevação da temperatura, ou seja, que os efeitos adversos da alta temperatura diminuiriam a M.OUR logo após o cultivo ser exposto à temperatura elevada. Entretanto, quando o aumento da temperatura foi para 40°C, a queda na M.OUR só foi percebida em 16 horas de cultivo, isto é, 6 horas após o aumento da temperatura. Quando a temperatura retornou para a temperatura ideal, ou seja, 34°C, o cultivo que sofreu o aumento de temperatura para 40°C (34-40-34)

apresentou uma velocidade de consumo de oxigênio semelhante àquela apresentada pelo cultivo isotérmico e, durante a fase estacionária, seu consumo de oxigênio foi também semelhante ao cultivo isotérmico (34-34-34). Já o cultivo que sofreu o aumento de temperatura para 45°C (34-45-34) apresentou uma queda na velocidade de consumo de oxigênio e, durante a fase estacionária deste cultivo, o consumo de oxigênio foi inferior àquela apresentado pelo cultivo isotérmico (34-34-34), sugerindo um efeito irreversível do tratamento térmico a que o fungo foi exposto.

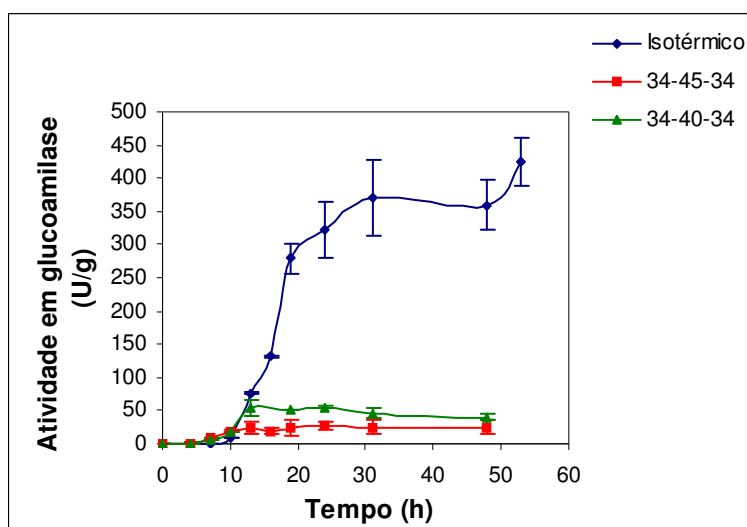
FIGURA 5.8 - PERFIL DO CONSUMO DE OXIGÊNIO DE *R. oryzae* CULTIVADO EM FARELO DE TRIGO ISOTERMICAMENTE A 34°C E NÃO ISOTERMICAMENTE, 34°C-45°C-34°C E 34°C-40°C-34°C.



O TRACEJADO ROSA INDICA O PERÍODO DO AUMENTO DA TEMPERATURA

O efeito do aumento da temperatura sobre a produção da enzima glucoamilase foi percebido logo após a imposição do aumento da temperatura (Figura 5.9). Quando a temperatura foi elevada para 45°C, a atividade da enzima manteve-se no mesmo nível a partir de 10 horas de cultivo, indicando que o efeito da elevação da temperatura sobre a produção da enzima foi imediato; já quando a temperatura aumentou para 40°C, houve um pequeno aumento do nível da enzima no meio, porém a partir de 13 h seu nível no substrato tornou-se constante.

FIGURA 5.9 EFEITO DO AUMENTO DE TEMPERATURA SOBRE A PRODUÇÃO DE GLUCOAMILASE DE *R. oryzae* CULTIVADO EM FARELO DE TRIGO EM BIORREATOR DE COLUNA



Este resultado é contrário àquele encontrado por IKASARI (1997): Quando o autor cultivou *R. oligosporus* em condição não isotérmica, o efeito do aumento da temperatura foi percebido claramente apenas nos estágios finais da fermentação (50-60 horas). Nos experimentos de IKASARI (1997), em 60 horas, a atividade em glucoamilase produzida nos cultivos que receberam um aumento da temperatura para 50°C (37-50-37) não foi nem metade da atividade alcançada nos cultivos isotérmicos realizados a 37°C, mas durante o tempo de 10 horas em que o fungo ficou exposto a 50°C o nível da enzima no substrato foi pouco diferente que o apresentado pelo controle (cultivo isotérmico a 37°C).

Os efeitos adversos de altas temperaturas sobre a produção da glucoamilase também foram observados por GHILDYAL *et al.* (1994) quando *A. niger* foi cultivado em farelo de trigo em um biorreator de coluna. Os autores estudaram os gradientes de temperatura que tipicamente ocorrem num processo de FES e a sua influência na produção de glucoamilase e observaram que a atividade desta enzima diminuiu próximo ao topo do biorreator de coluna, onde a temperatura foi constatada ser maior. Isto indica a temperatura como um fator de primeira importância em biorreatores de leito fixo.

Os resultados do presente trabalho mostram a importância da necessidade das estratégias de controle da temperatura em FES, ou seja, mostra que um

aumento de somente 6°C é capaz de reduzir significativamente a produção de enzimas, que são produtos comuns em processos de FES. Note-se que os aumentos de temperatura do cultivo para 45°C e 40°C provavelmente afetaram a produção da enzima. É pouco provável que causaram a sua desativação uma vez que, segundo IKASARI (1997) a glucoamilase de *Rhizopus* é estável em temperaturas em torno de 55°C, tal que isto é a temperatura utilizada na aplicação da glucoamilase de *Rhizopus* de fontes comerciais (SIGMA).

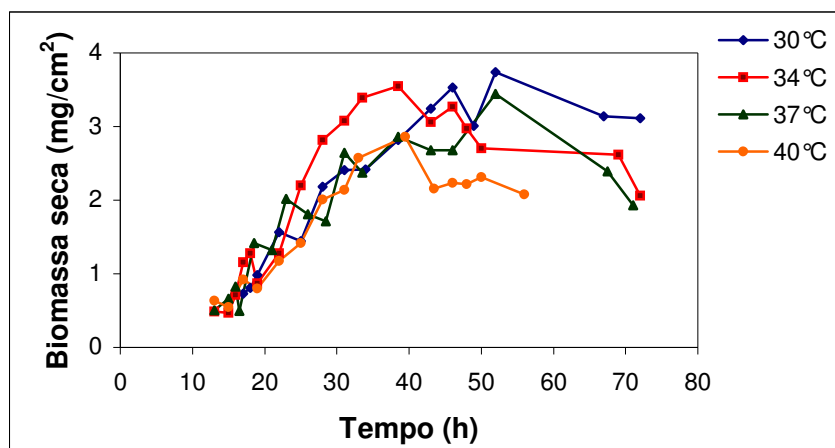
5.3 COMPORTAMENTO CINÉTICO DE *Rhizopus oryzae* EM SISTEMA OVERCULTURE

Uma vez que não foi possível converter a medida da velocidade de consumo de oxigênio em biomassa utilizando a glucosamina como indicador indireto de crescimento celular, optou-se trocar o sistema de biorreatores de colunas por outro que permitiu a total recuperação da biomassa formada, tornando possível sua quantificação: o sistema *overculture*. Por este sistema, apresentado no item 2.1.4, avaliou-se o comportamento cinético de *R. oryzae* frente aos aumentos de temperatura impostos durante o ciclo de crescimento e também frente ao retorno da temperatura, após o seu aumento, para aquela ideal de cultivo, conforme estratégia apresentada no item 4.10.

5.3.1 Avaliação do Comportamento Cinético de *R. oryzae* em Sistema *Overculture* em Abordagem Isotérmica

Os perfis de crescimento de *R. oryzae* cultivado em abordagem isotérmica, frente a quatro temperaturas 30°C, 34°C, 37°C e 40°C, já foram mostrados na Figura 5.2 com o ajuste da equação Logística. A Figura 5.10 traz os mesmos perfis, mas sem as curvas do ajuste da equação Logística. Embora o ajuste da equação Logística forneça um valor de X_{\max} para 30 °C maior que aquele para 34 °C (Tabela 5.3), pode-se perceber pela Figura 5.10 que, experimentalmente, não existe diferença entre este parâmetro.

FIGURA 5.10. PERFIL DE CRESCIMENTO DE *R. oryzae* EM CULTIVO ISOTÉRMICO EM 4 TEMPERATURAS DIFERENTES



Este estudo em condições isotérmicas, já discutido no item 5.1.4, teve a intenção de proporcionar um conhecimento de como o fungo se comportaria frente a algumas temperaturas. Foi importante para se conhecer o perfil de crescimento e para poder definir como e quando os aumentos de temperatura seriam impostos.

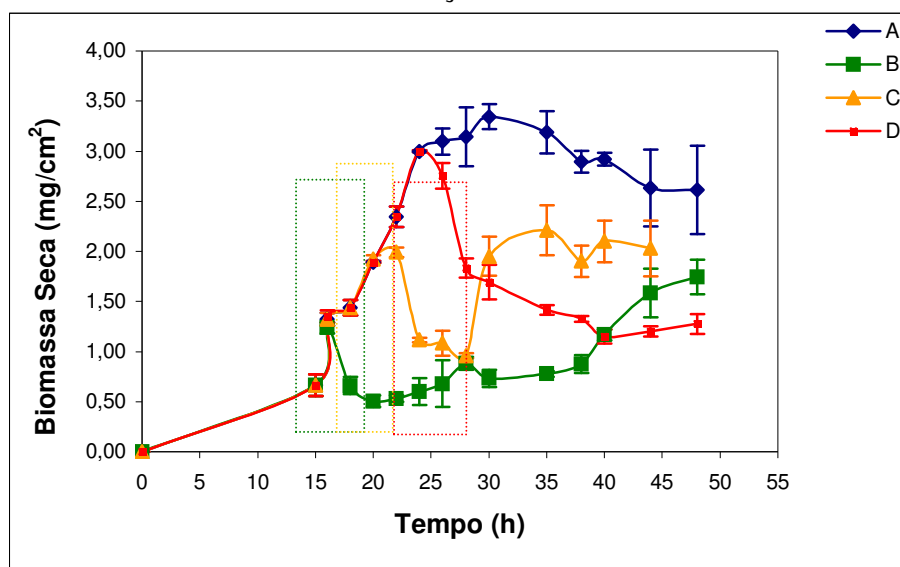
5.3.2 Avaliação do Comportamento Cinético de *R. oryzae* em Sistema *Overculture* em Abordagem Não Isotérmica

Em FES, as condições isotérmicas não são mantidas. A temperatura inicia-se na temperatura ideal de crescimento e aumenta quando se inicia a fase de crescimento rápido, conforme já discutido no item 2.1.8. A resposta do fungo frente a tal variação durante seu ciclo de crescimento pode diferir daquela resposta frente a temperaturas constantes, isto é, sob condições isotérmicas.

Com a finalidade de proporcionar conhecimentos sobre as mudanças na cinética de crescimento do fungo frente às variações de temperatura em um sistema de FES, vários cultivos de *Rhizopus oryzae* foram iniciados com a temperatura de 34°C e depois submetidos a um período de 6 horas a 45°C (e em outro experimento a 40°C), retornando após este período de 6 horas para 34°C. O intervalo de tempo de 6 horas que o fungo fica exposto à temperatura alta foi escolhido baseado na Figura 5.10 que mostra que o fungo *R. oryzae* apresenta um período de rápido

crescimento de aproximadamente 10 horas. A Figura 5.11 mostra o perfil obtido para vários cultivos iniciados em 34°C que foram mudados para 45°C em tempos diferentes e também um cultivo controle mantido isotermicamente a 34°C.

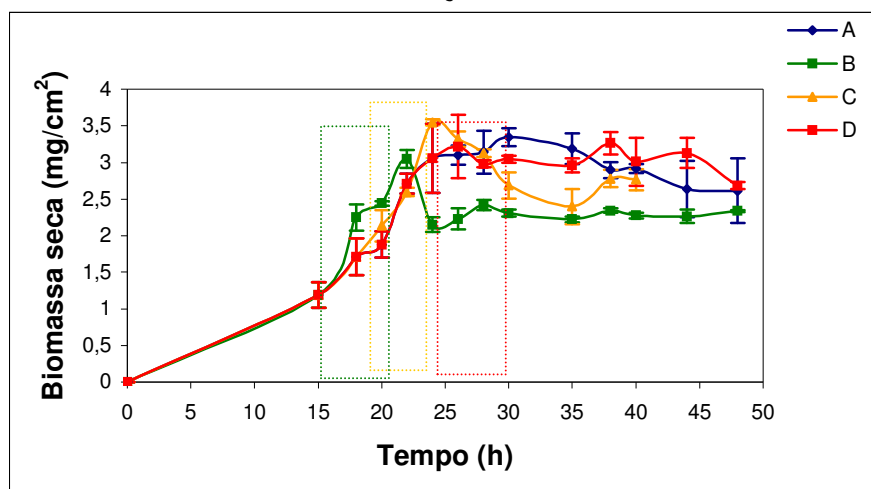
FIGURA 5.11 - PERFIL DA BIOMASSA SECA DE *R. oryzae* EM VÁRIOS REGIMES DE INCUBAÇÃO.



- A** – INCUBAÇÃO ISOTÉRMICA, 34°C;
B – T PARA 45°C EM t=15 h E VOLTA PARA 34°C EM t=21 h;
C = T PARA 45°C EM t=18 h E VOLTA PARA 34°C EM t=24 h;
D = T PARA 45°C EM t=24 h E VOLTA PARA 34°C EM t=30 h

A Figura 5.12 mostra o perfil cinético para vários cultivos iniciados em 34°C e que foram mudados para 40°C em tempos diferentes e também um cultivo controle mantido isotermicamente a 34°C.

FIGURA 5.12 - PERFIL DA BIOMASSA SECA DE *R. oryzae* EM VÁRIOS REGIMES DE INCUBAÇÃO.



A – INCUBAÇÃO ISOTÉRMICA, 34 °C

B – T PARA 40 °C EM t=15 h E VOLTA PARA 34 °C EM t=21 h

C = T PARA 40 °C EM t=18 h E VOLTA PARA 34 °C EM t=24 h

D = T PARA 40 °C EM t=24 h E VOLTA PARA 34 °C EM t=30 h

Quando *R. oryzae* é exposto a uma temperatura de 45 °C às 15 horas de cultivo (linha B em verde na Figura 5.11), e mantido nela por um período de 6 horas, ele não recupera mais a sua velocidade de crescimento, mesmo após o retorno da temperatura para 34 °C em 21 horas de cultivo. O fungo ainda cresce durante 1 hora e a partir de 16 horas de cultivo seu crescimento cessa, voltando a crescer lentamente mais tarde, a partir de 38 horas de cultivo. No cultivo C, linha amarela, onde o aumento da temperatura ocorreu em 18 horas de cultivo, observa-se que o fungo continuou crescendo por 4 horas e, após uma queda na biomassa seca e um período de aproximadamente 4 horas de biomassa seca inalterada, o fungo apresenta um curto mas rápido período de recuperação, porém sem atingir o valor máximo de biomassa de 3,34 mg/cm² que foi obtido no cultivo isotérmico em 34 °C. Quando o aumento de temperatura acontece em 24 horas de cultivo, cultivo D, linha vermelha, observa-se uma queda brusca na biomassa seca durante o período das 6 horas subseqüentes durante as quais o microrganismo ficou exposto à temperatura de 45 °C, não se recuperando após o retorno da temperatura para 34 °C. Uma recuperação de biomassa neste cultivo D não seria esperada uma vez que durante o cultivo isotérmico na temperatura ideal de 34 °C (linha A em azul) em 24 horas a produção de biomassa já está desacelerando bruscamente.

A Figura 5.11 sugere que a idade do micélio é um fator de importância quando se trata de recuperação do crescimento. Aparentemente quando o fungo é exposto à temperatura de 45°C no meio do seu ciclo de crescimento, ele apresenta um poder maior de recuperação. Já quando o aumento de temperatura para 45°C acontece nos estágios iniciais e finais do ciclo de crescimento, seu poder de recuperação é bem inferior, como mostrado pelas linhas B e D da Figura 5.11.

Quando o fungo foi exposto a uma temperatura de 40°C durante um período de 6 horas (Figura 5.12), não houve um efeito claro imediato da temperatura. Quando este aumento foi imposto em 15 horas de cultivo, linha B em verde, o fungo continuou a crescer até 22 horas de cultivo. Isto mostra que o efeito deletério da temperatura de 40°C demorou 7 horas para se tornar evidente, ou seja, o efeito deletério somente manifestou-se 1 hora após o retorno da temperatura para 34°C. Porém, mesmo continuando a crescer, a biomassa máxima alcançada de 3,05 mg/cm² é inferior àquela alcançada no cultivo isotérmico a 34°C de 3,34 mg/cm². Após estas 7 horas, este cultivo apresentou uma queda na biomassa seca que tornou-se estável a partir das 24 horas de cultivo. Quando o fungo sofreu o aumento de temperatura em 18 horas de cultivo (linha C em amarelo), ele apresentou essencialmente o mesmo comportamento do cultivo representado pela linha B. O fungo continuou a crescer até 26 horas de cultivo, ou seja, levou 8 horas para que efeito da temperatura de 40°C se mostrasse claro, 2 horas após o retorno da temperatura para 34°C. Após este tempo a biomassa seca apresentou uma queda até 30 horas de cultivo mantendo-se, então, estável. Aqui, porém, a biomassa máxima alcançada chegou a 3,32 mg/cm², igual ao valor do cultivo isotérmico em 34°C. Quando o aumento da temperatura para 40°C aconteceu em 24 horas de cultivo, o fungo continuou a crescer por mais duas horas; então, apresentou uma pequena queda na biomassa seca, que manteve-se estável a partir de 28 horas de cultivo. Aqui a biomassa máxima alcançada foi de 3,22 mg/cm², pouco diferente do valor do cultivo isotérmico em 34 °C

O quadro representado na Tabela 5.7 mostra de maneira resumida o tempo para que os efeitos negativos do aumento de temperatura para 45°C e para 40°C se manifestem na forma de desaparecimento de biomassa.

TABELA 5.7. RESUMO DOS EFEITOS DO AUMENTO DA TEMPERATURA DURANTE CULTIVO DE *R.oryzae* SOB CONDIÇÕES NÃO ISOTÉRMICAS EM SISTEMA OVERCULTURE

Choque térmico (°C)	Tempo de cultivo para o aumento de temperatura (h)	Tempo para surgir o efeito negativo do aumento da temperatura (h)	Biomassa máxima alcançada (mg/cm ²)
45	15	1	1,74
	18	4	2,21
	24	t<1	2,99
40	15	7	3,05
	18	8	3,32
	24	2	3,22
Isotérmico (34 °C)	-	-	3,34

Estes resultados mostram que tanto o aumento de temperatura para 45°C como o aumento para 40°C provocaram efeitos deletérios no fungo. Porém a resposta do microrganismo não foi imediata; foi mais rápida quando a temperatura foi aumentada para 45°C (até 4 horas após o aumento) e tardia quando a temperatura foi aumentada para 40°C (até 8 horas após o aumento). A resposta negativa de *R. oryzae* às elevações de temperatura foi percebida pela queda da biomassa sem completa recuperação quando a temperatura retornou para 34°C. Entretanto, o aumento da temperatura para 40°C, apesar de ter levado mais tempo para se manifestar e igualmente não permitir a recuperação da velocidade de crescimento em nenhum dos cultivos, permitiu que todos os cultivos alcançassem valores de biomassa próximos aos valores de X_{\max} antes do efeito negativo da temperatura se manifestar. Já o aumento da temperatura para 45°C, que provocou uma resposta mais rápida quando comparado ao aumento para 40°C, teve um efeito deletério mais intenso. O efeito, porém, foi dependente do tempo de cultivo em que o tratamento foi imposto, pois uma certa recuperação da velocidade de crescimento quando a temperatura retornou para 34°C foi observada, com o grau de recuperação dependendo do tempo em que o aumento foi imposto.

O estresse causado por uma temperatura mais alta que a temperatura ótima de cultivo sobre um organismo foi investigado por alguns autores. Um organismo em condições de estresse empenha-se em manter as atividades funcionais da célula (FEOFILOVA, 1994). Este estado é percebido imediatamente após a exposição ao fator de estresse e persiste por um tempo relativamente curto e é seguido ou por um re-estabelecimento ou pela morte do organismo. Durante um estudo comparativo concernente aos efeitos da temperatura sobre a composição lipídica de algumas espécies de fungos filamentosos, foram observadas alterações na composição de grupos acil dos lipídios, na composição fosfolipídica e nos teores de esteróis e outros lipídios neutros (FEOFILOVA *et al.* 2000). Um outro estudo sobre o efeito da temperatura foi realizado investigando-se a síntese de ribossomos em *E. coli*. Este mostrou que o teor de ribossomos total e o teor em funcionamento diminuíram com o aumento da temperatura, enquanto que o teor de ribossomos não funcionais permaneceu inalterado (YUN, HONG & LIM, 1996).

Da mesma forma, em *S. cerevisiae* a expressão gênica é remodelada em resposta a mudanças no ambiente extracelular, incluindo mudanças na temperatura (CAUSTON *et al.* 2001). Muitos dos genes cuja expressão é induzida e permanece elevada após um aumento de temperatura têm funções relacionadas ao enovelamento de proteínas e transporte, entre eles o EUG1 e o LHS1, que são regulados por resposta a proteínas desnaturadas (CAUSTON *et al.*, 2001).

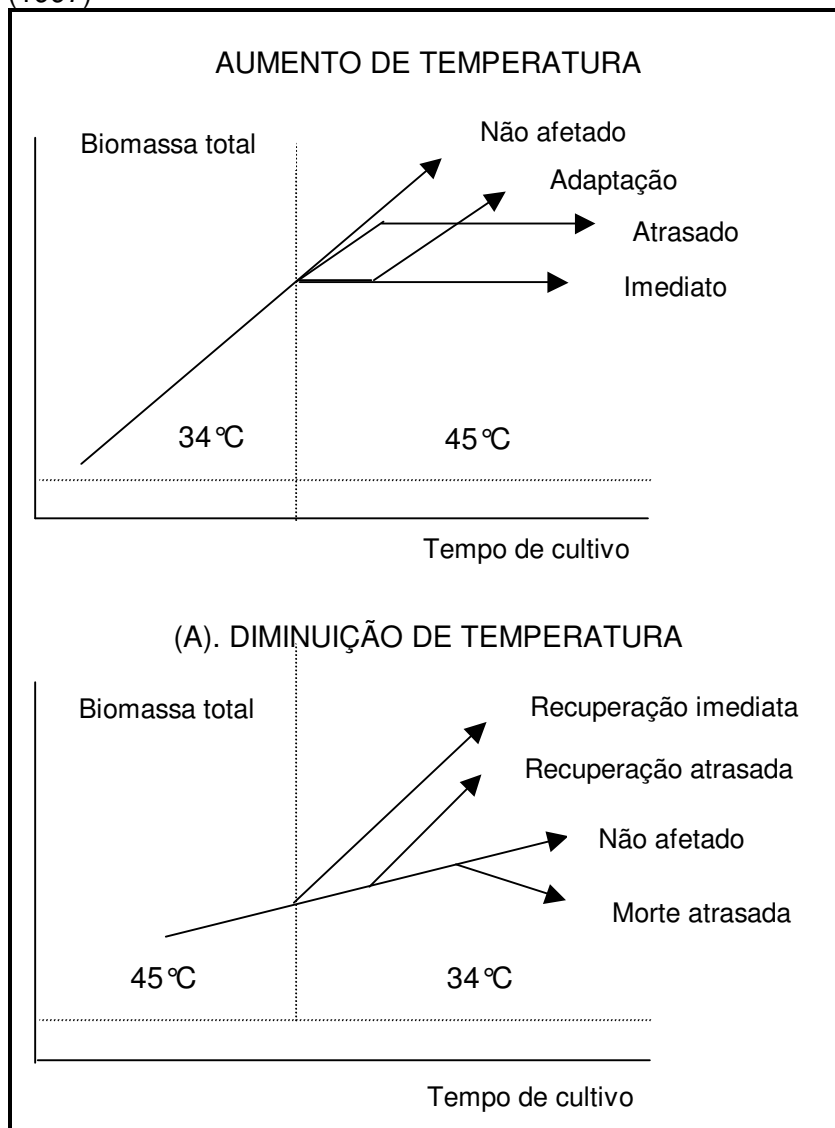
Com a exceção do trabalho sobre os níveis de ribossomos, estas informações são pouco relevantes para explicar os resultados aqui alcançados, pois não auxiliam na compreensão do mecanismo da queda na biomassa seca. Esta diminuição da biomassa seca implica em algo mais que uma simples morte, pois uma célula pode morrer, perder a capacidade de metabolizar, mas sua matéria seca pode permanecer íntegra. Os resultados alcançados aqui indicam a ocorrência, além da morte da célula, de uma autólise.

Enquanto alterações fisiológicas são efetuadas pelo microrganismo ao tentar se adaptar às novas temperaturas, pode-se esperar uma diminuição de sua taxa de crescimento já que o processo de adaptação consumiria energia. Porém, estudos fisiológicos não têm considerado os impactos destas mudanças fisiológicas sobre a velocidade de crescimento. Embora qualquer adaptação deva custar energia para a célula, a velocidade de crescimento pode talvez aumentar em vez de diminuir,

devido a um efeito geral de aumento na velocidade das reações metabólicas causadas por um aumento na temperatura. Estes estudos se tornariam ainda mais complexos em ambientes proporcionados pela FES, onde a medida do crescimento não é fácil tornando difícil a observação do efeito da temperatura sobre as mudanças na velocidade de crescimento (IKASARI, 1997).

Em um trabalho similar, IKASARI (1997) estudou o crescimento de *Rhizopus oligosporus* em sistema *overculture* onde variações de temperatura foram impostas durante seu ciclo de crescimento e observou que quando o fungo iniciou seu crescimento com a temperatura ótima e sofreu um aumento na temperatura, ele não recuperou sua velocidade de crescimento nem conseguiu recuperar o valor máximo em biomassa que apresentou quando cultivado isotermicamente em temperatura ótima. Assim, o trabalho de IKASARI (1997) ofereceu 4 hipóteses que podem acontecer a um fungo quando o mesmo é exposto a um aumento de temperatura (Figura 5.13) e quando o fungo tem retorno a sua temperatura ideal (Figura 5.13 (A)).

FIGURA.5.13 - RESPOSTAS DO FUNGO ÀS MUDANÇAS NA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO ADAPTADA DE IKASARI (1997)



As 4 possíveis respostas ao aumento da temperatura (no caso de 34 °C para 45 °C ou 40 °C) ilustradas na Figura 5.13 são as seguintes:

1. Nenhuma resposta: o fungo se adapta à temperatura elevada sem nenhuma mudança na velocidade de crescimento.
2. Adaptação: o fungo ajusta-se ao aumento da temperatura e a velocidade de crescimento é diminuída durante um período relativamente curto de adaptação. Após este curto período de adaptação, o fungo crescerá na mesma velocidade que possuía antes do aumento da temperatura.

3. Resposta atrasada: efeitos adversos da alta temperatura levam algum tempo para se mostrar. Isto pode ocorrer devido a uma incapacidade do fungo para ajustar-se à alta temperatura.

4. Resposta imediata: efeitos adversos da alta temperatura podem diminuir ou cessar o crescimento tão logo o cultivo é exposto à elevada temperatura.

Os resultados aqui alcançados ilustrados nas Figuras 5.11 e 5.12 e sumarizados na Tabela 5.7 para os aumentos de temperatura para 45°C e 40°C respectivamente, mostram que além do fungo *R. oryzae* apresentar uma resposta atrasada ao aumento de temperatura, independente do tempo de cultivo em que o aumento ocorreu, ele perdeu massa seca. Esta perda de massa seca não foi observada no fungo *R. oligosporus* nos experimentos conduzidos por IKASARI (1997).

As 4 possíveis respostas ao retorno da temperatura (no caso de 45°C ou 40°C para 34°C) ilustradas na Figura 5.13 (A) são as seguintes:

1. Recuperação imediata: o fungo cresce imediatamente na velocidade normal de crescimento para a temperatura mais baixa.

2. Recuperação atrasada: leva algum tempo para o fungo voltar a crescer na velocidade de crescimento normal para a temperatura mais baixa.

3. Não afetado: a velocidade de crescimento permanece constante na velocidade correspondente à temperatura mais alta.

4. Morte atrasada: a velocidade de crescimento não é simplesmente uma função das condições atuais, mas depende dos tratamentos prévios que o fungo recebeu anteriormente. Um processo irreversível que se iniciou no período de altas temperaturas agora leva à morte.

Os resultados alcançados aqui neste trabalho sugerem que a resposta do fungo *R. oryzae* ao retorno da temperatura alta para 34°C depende do tempo de cultivo em que o aumento da temperatura aconteceu. Os resultados dos experimentos em que aumentos de temperatura foram impostos muito cedo nos cultivos indicaram que alguns danos causados pela alta temperatura podem ser irreversíveis, ou seja, quando acontece o retorno da temperatura para 34°C o fungo

simplesmente não se recupera nem segue com a velocidade do cultivo isotérmico a 34°C (cultivos B nas Figuras 5.11 e 5.12). Quando o aumento da temperatura acontece durante a fase de crescimento rápido, seu retorno a temperatura ideal parece permitir uma rápida recuperação atrasada seguida de morte (linha C da Figura 5.11). O aumento para 40°C neste mesmo tempo de cultivo parece não afetar a velocidade de crescimento, mas os resultados indicam que também causa danos irreversíveis à célula não permitindo nenhum tipo de recuperação (linha C da Figura 5.12). Já um aumento de temperatura imposto próximo ao período normal de declínio do fungo quando cultivado isotermicamente na temperatura ideal de 34°C provoca danos irreversíveis à célula, levando-a à morte (linhas D das Figuras 5.11 e 5.12). Estes efeitos não foram observados por IKASARI (1997) uma vez que o autor não impôs aumentos de temperaturas em vários tempos diferentes do cultivo. Seus resultados não foram consistentes com uma recuperação rápida, mas mostraram-se consistentes com as outras 3 possibilidades.

Existem na literatura vários trabalhos que investigam o efeito de variações na temperatura sobre o crescimento de microrganismos feitos no contexto de controle de crescimento microbiano em alimentos. Entretanto, a grande maioria destes estudos trata deste efeito sobre o crescimento de bactérias em experimentos conduzidos em meio líquido. Alguns estudos envolvem medidas do crescimento radial de fungos, mas são baseados no crescimento de uma única colônia, o que não reflete a realidade de uma FES onde ocorre o crescimento de múltiplas colônias ao mesmo tempo. Além disto, a ênfase destes estudos é dada ao efeito da variação da temperatura sobre a fase lag do crescimento enquanto que, para a FES, é importante considerar o aumento na biomassa seca durante a fase rápida de crescimento, uma vez que é nesta fase que ocorre uma grande liberação de calor metabólico que é responsável pelo aumento da temperatura do meio fermentativo com já mostrado no item 2.1.3.1.

5.4 MODELO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *R. oryzae* EM CULTIVO SOBRE PLACAS

O processo de FES apresenta um grande potencial para produzir certos metabólitos mais eficientemente que o processo de fermentação submersa. Apesar de todo este potencial, poucos dos muitos estudos conduzidos em laboratório fazem a transição para uma escala maior. Isto se deve, muitas vezes, ao fato de que existe uma dificuldade muito grande em se controlar as variáveis-chave deste processo em um biorreator de grande escala nos seus valores ótimos para promover o crescimento e a produção do metabólito desejável. Devido a esta dificuldade, estratégias de controle baseadas em modelos são requeridas para a padronização e otimização de operação dos biorreatores de grande escala. Os modelos devem descrever, além dos balanços de massa e energia do biorreator, os quais determinam os valores das variáveis-chave do processo, a cinética de crescimento microbiano como uma função destas variáveis.

A temperatura do leito é uma das variáveis-chave mais importantes de um processo de FES e seu controle é uma das maiores dificuldades em biorreatores de grande escala. Na maioria das vezes, a FES envolve o cultivo de fungos filamentosos, que podem ser injuriados durante a movimentação do leito fermentativo, fazendo com que os processos de FES sejam, em sua maioria, estáticos ou agitados de maneira intermitente. A consequência disto é a impossibilidade de manter a temperatura do processo em valores ideais para o crescimento e, desta maneira, o microrganismo vivenciará variações de temperatura durante o processo. A equação cinética deverá ser capaz de descrever os efeitos destas variações de temperatura sobre o crescimento do microrganismo.

Os estudos cinéticos e a conseqüente modelagem matemática do crescimento fúngico em FES apresentam muitas limitações. Dentre as limitações, a mais crucial é a impossibilidade de quantificar diretamente a biomassa, ou seja, é impossível separar o micélio fúngico do substrato sólido para determinar seu crescimento quantitativamente. Para suprir a dificuldade de medição da biomassa, estudos do crescimento do fungo são conduzidos, por vezes, utilizando o sistema *overculture* (item 2.1.4) que, embora não represente um sistema real de FES,

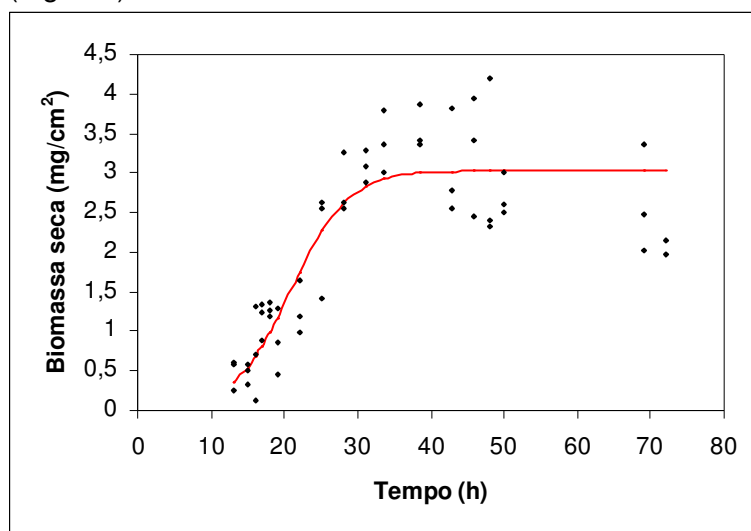
permite a medição direta da biomassa e mimetiza a FES de uma maneira mais próxima que o cultivo líquido.

Nesta seção é apresentado o desenvolvimento de um modelo empírico que descreve o comportamento cinético do fungo *R. oryzae* cultivado em sistema *overculture* frente a variações de temperatura.

5.4.1 Desenvolvimento do Modelo

Os experimentos conduzidos em condições isotérmicas que foram apresentados no item 5.1.4 foram fundamentais para a determinação da forma básica do perfil de crescimento, o que facilita a seleção de uma equação empírica apropriada. Estes perfis evidenciaram um decréscimo na biomassa seca na fase final de crescimento do fungo e deixaram claro que a Equação Logística (item 4.8) não descreve esta fase final do ciclo de crescimento de *R. oryzae*, como pode-se observar na Figura 5.14. Este modelo ajusta apenas aqueles perfis que apresentam uma assíntota nesta fase final, isto é, comportamentos cinéticos que não apresentam uma diminuição da biomassa. Então, procurou-se desenvolver um modelo que descrevesse esta fase final do ciclo de crescimento de *R. oryzae* e isto foi feito introduzindo-se à Equação Logística um termo que descrevesse o desaparecimento de biomassa.

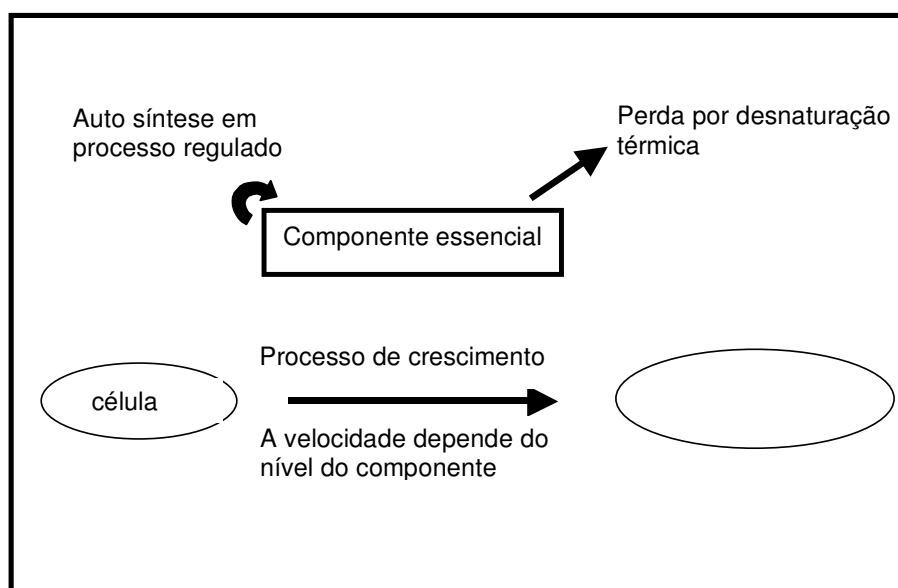
FIGURA 5.14 - PERFIL DO AJUSTE DA EQUAÇÃO LOGÍSTICA AOS DADOS DE BIOMASSA SECA (mg/cm^2) DE CULTIVO ISOTÉRMICO A 34°C



O modelo teria que ser capaz de descrever os efeitos do aumento da temperatura sobre a cinética de crescimento do fungo e de forma que a expressão pudesse, ainda, ser aplicada em um modelo que descreva a operação de um biorreator, ou seja, na forma de uma expressão empírica simples que ajuste bem os dados provenientes dos experimentos.

O modelo desenvolvido nesta tese postula que o crescimento é controlado pelo nível de um componente intracelular essencial denominado de “F”. Não há nada nesta proposta que especifique a identidade de “F”, embora seja possível se afirmar que “F” deve ser um componente complexo. “F” poderia representar, por exemplo, um conjunto de enzimas, ou seja, uma “maquinaria enzimática”. Uma característica importante de “F” é que ele é responsável pela sua própria síntese como também desempenha um importante papel na determinação da velocidade de crescimento. Além disso, o componente “F” também sofre desnaturação térmica (Figura 5.15). O nível do componente “F” representaria o estado fisiológico da célula, ou seja, a viabilidade celular. O nível deste componente no interior da célula foi expresso em termos adimensionais e portanto, variável entre 0 e 1, onde o valor 1 representa o nível normal do componente dentro de uma célula totalmente viável.

FIGURA 5.15 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MODELO CINÉTICO MOSTRANDO O PAPEL CENTRAL DO COMPONENTE ESSENCIAL INFLUENCIANDO O CRESCIMENTO CELULAR COMO SUA PRÓPRIA SÍNTESE



A velocidade de auto síntese de F é controlada pela célula e regida pela versão “*power law*” (lei de potência) da Equação Logística enquanto que sua desnaturação segue um processo de decaimento de 1ª ordem:

$$\frac{dF}{dt} = k_s F(1 - F^n) - k_D F \quad (5.1)$$

onde F corresponde ao nível do componente chave, n o expoente da Equação Logística que caracteriza a versão *power law* da Equação Logística, t é o tempo (h) e k_s e k_D são os coeficientes das reações de síntese e de desnaturação (h^{-1}), respectivamente. Estes coeficientes são expressos como funções da temperatura de acordo com a equação de Arrhenius:

$$k_s = A_s \exp\left(\frac{-E_s}{R(T + 273)}\right) \quad (5.2)$$

$$k_D = A_D \exp\left(\frac{-E_D}{R(T + 273)}\right) \quad (5.3)$$

onde A_s e A_D são os fatores de frequência para as reações de síntese e de desnaturação, respectivamente (h^{-1}), E_s e E_D são as energias de ativação para as reações de síntese e de desnaturação, respectivamente (J mol^{-1}), R é a constante universal dos gases ($\text{J mol}^{-1} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$) e T é a temperatura ($^\circ\text{C}$).

Conforme este modelo, mudanças que ocorrem na temperatura não alteram a constante da velocidade específica de crescimento para uma célula totalmente saudável, isto é, uma célula que contém a concentração normal do componente essencial F (ou seja, quando $F=1$). O efeito da temperatura sobre a velocidade de crescimento da célula é devido ao efeito da temperatura sobre o nível do componente essencial F .

Para descrever a diminuição da biomassa na fase final de crescimento, foi incorporado à equação um coeficiente de desaparecimento de biomassa seca, k_{DX} .

Este coeficiente também pode ser expressa como uma função da temperatura conforme a equação de Arrhenius:

$$k_{DX} = A_{DX} \exp\left(\frac{-E_{DX}}{R(T + 273)}\right) \quad (5.4)$$

O microrganismo cresce de acordo com a Equação Logística com desaparecimento de biomassa conforme cinética de primeira ordem. Portanto, a equação, chamada de Modelo 1 fica assim descrita:

$$\frac{dX}{dt} = \mu FX \left(1 - \frac{B}{X_{\max}}\right) - k_{DX} X \quad (5.5)$$

onde X é a quantidade de biomassa (mg cm^{-2}), X_{\max} é a máxima quantidade possível de biomassa (mg cm^{-2}), B é a biomassa acumulativa (mg cm^{-2}), a soma da biomassa atual com aquela que existiu e não existe mais, μ é a constante da velocidade específica de crescimento para uma célula totalmente saudável na temperatura ideal de crescimento (h^{-1}), F é o nível do componente essencial e k_{DX} é a constante de desaparecimento da biomassa (h^{-1}).

A biomassa acumulativa, B , é descrita de acordo com a seguinte equação:

$$\frac{dB}{dt} = \mu FX \left(1 - \frac{B}{X_{\max}}\right) \quad (5.6)$$

Nos experimentos conduzidos de forma não isotérmica foram observados dois comportamentos: (1) o fungo continuou a crescer bem no início da exposição à temperatura alta, e somente depois de umas horas apresentou uma desaceleração do crescimento e desaparecimento de biomassa; (2) mesmo recuperando-se no

retorno para a temperatura de 34 °C, a biomassa não alcançou os valores obtidos nas incubações isotérmicas feitos em 34 °C.

Na intenção de descrever matematicamente este comportamento, a equação 5.5 (Modelo 1) foi assim reescrita dando origem ao Modelo 2:

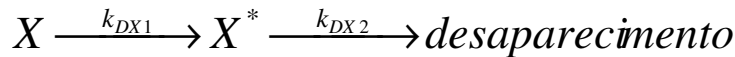
$$\frac{dX}{dt} = \mu F (X^* + X) \left(1 - \frac{B}{X_{\max}} \right) - k_{DX1} X \quad (5.7)$$

onde X é a quantidade de biomassa do substrato sólido (mg.cm^{-2}), X_{\max} é a máxima quantidade possível de biomassa (mg.cm^{-2}), B é a biomassa acumulativa (mg.cm^{-2}), X^* é a biomassa “injurada” – aquela que está marcada para “desaparecer”, μ é a constante da velocidade específica de crescimento para uma célula totalmente saudável, F é o nível do componente essencial e k_{DX1} é a constante de velocidade do processo de conversão de biomassa em biomassa injurada.

A biomassa “injurada”, X^* , é descrita em função do tempo de acordo com a seguinte equação:

$$\frac{dX^*}{dt} = k_{DX1} X - k_{DX2} X^* \quad (5.8)$$

O mecanismo que leva o fungo saudável a um estado “injurado” e, conseqüentemente ao seu desaparecimento é assim postulado:



onde k_{DX2} é a constante da velocidade de reação de desaparecimento da biomassa injurada.

Neste Modelo 2, então, é postulado que a biomassa X , quando exposta a uma temperatura mais elevada que a ideal, não morre imediatamente, ela passa por um estado intermediário de biomassa injurada, que ainda contribui para o

crescimento, mas que sofre um processo de autólise, ou seja, ela está desaparecendo num processo de primeira ordem. Também é postulado que a velocidade específica de crescimento, μ , varia com a temperatura, uma vez que quando a temperatura aumenta, a velocidade específica de crescimento também pode aumentar.

5.4.2 Apresentação dos Parâmetros

Os parâmetros dos modelos 1 e 2: A_D , A_S , E_D , E_S , n , k_{DX} , μ , X_0 e X_{\max} foram necessários para prever a concentração da biomassa frente às variações de temperatura nos cultivos realizados nas placas de Petri em sistema *overculture* e foram determinados tendo como base os dados experimentais. Os valores para os fatores de frequência para as reações de síntese e de desnaturação, A_S e A_D , para as energias de ativação para as reações de síntese e de desnaturação, E_S e E_D , respectivamente e para n , expoente da Equação Logística que caracteriza a versão *power law* desta equação, foram selecionados, por um processo de tentativa e erro, de modo a proporcionar um ajuste razoável aos dados experimentais. Os valores para μ , constante da velocidade específica de crescimento para uma célula totalmente saudável na temperatura ideal de crescimento e X_{\max} , a máxima quantidade possível de biomassa alcançada foram estimados dos dados experimentais provenientes do cultivo realizado na temperatura ideal de 34°C durante todo o ciclo de crescimento. O valor para k_{DX1} , a constante da velocidade de reação de conversão da biomassa viva em biomassa injuriada e o valor para k_{DX2} , a constante da velocidade de reação de desaparecimento da biomassa injuriada, foram obtidos a partir dos dados experimentais correspondentes à fase de decaimento da biomassa e também foram selecionados de modo a proporcionar o melhor ajuste das equações aos dados experimentais. O valor de X_0 , a concentração inicial de biomassa, foi escolhido de forma a proporcionar o melhor ajuste das equações aos dados experimentais uma vez que amostras antes de 15 horas de cultivo são impossíveis de se coletar para este microrganismo em sistema *overculture*. Os parâmetros de melhor ajuste no modelo para os dados experimentais são dados na Tabela 5.8:

TABELA 5.8 - VALORES ESTIMADOS PARA OS PARÂMETROS UTILIZADOS NOS MODELOS 1 E 2 PARA PREDIZER A CONCENTRAÇÃO DA BIOMASSA DE *R. oryzae* CULTIVADO EM SISTEMA *OVERCULTURE* FRENTE ÀS VARIAÇÕES DE TEMPERATURA

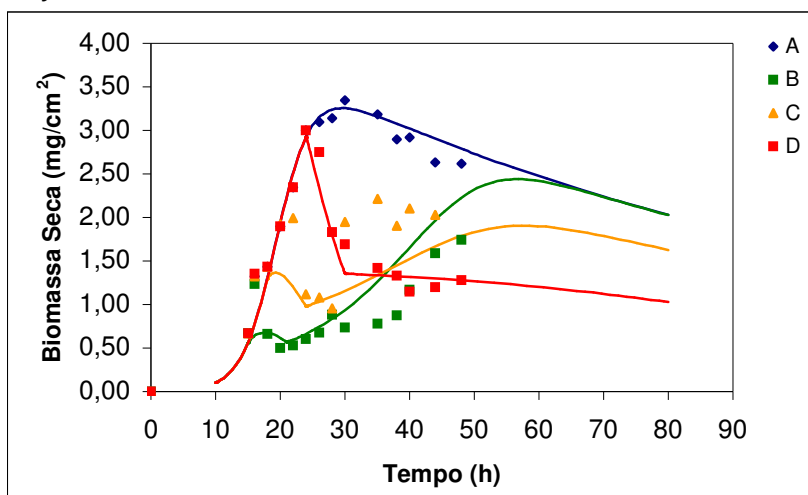
Parâmetros	Valores	Unidades
A_D	1×10^{63}	h^{-1}
A_S	10,23077	h^{-1}
E_D	386800,5	J mol^{-1}
E_S	14289,27	J mol^{-1}
n	10	adimensional
μ (34 °C)	0,385	h^{-1}
μ (40 °C)	0,7	h^{-1}
μ (45 °C)	0,7	h^{-1}
X_0	0,01	mg cm^{-2}
k_{DX} (34 °C)	0,01	h^{-1}
K_{DX} (40 °C, modelo 1)	0,0595	h^{-1}
K_{DX} (45 °C, modelo 1)	0,15	h^{-1}
K_{DX1} (40 °C, modelo 2)	0,03	h^{-1}
K_{DX1} (45 °C, modelo 2)	0,15	h^{-1}
K_{DX2} (40 °C, modelo 2)	0,09	h^{-1}
K_{DX2} (45 °C, modelo 2)	1,00	h^{-1}
X_{\max}	3,7	mg cm^{-2}
R^*	8,314	$\text{J mol}^{-1} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$

(*) HIMMELBLAU (1982)

5.4.3 Aplicação dos Modelos 1 e 2 para os Dados de Biomassa Provenientes de Cultivos Não Isotérmicos

As Figuras 5.16 e 5.17 mostram os ajustes do modelo quando os cultivos foram submetidos ao aumento de temperatura para 45 °C e 40 °C, respectivamente.

FIGURA 5.16 - AJUSTE DO MODELO 1 AOS DADOS EXPERIMENTAIS DO PERFIL DE CRESCIMENTO DE *R. oryzae*.



A – INCUBAÇÃO ISOTÉRMICA, 34 °C

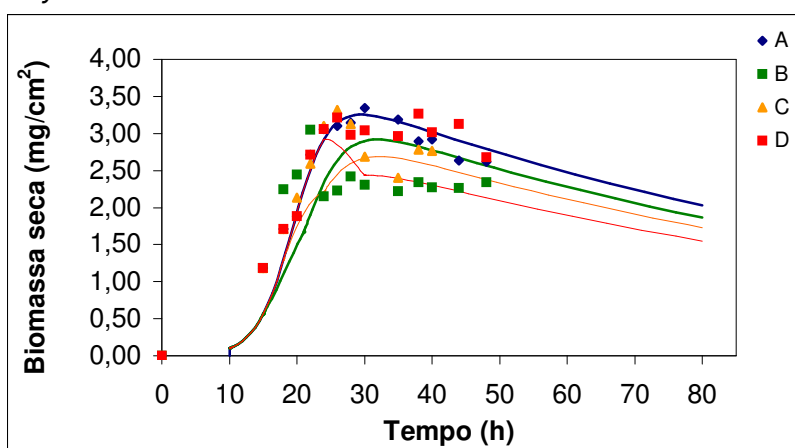
B – T PARA 45 °C EM t=15h E VOLTA PARA 34 °C EM t=21h

C – T PARA 45 °C EM t=18h E VOLTA PARA 34 °C EM t=24h

D – T PARA 45 °C EM t=24h E VOLTA PARA 34 °C EM t=30h

- = AJUSTE DO MODELO

FIGURA 5.17 - AJUSTE DO MODELO 1 AOS DADOS EXPERIMENTAIS DO PERFIL DE CRESCIMENTO DE *R. oryzae*.



A – INCUBAÇÃO ISOTÉRMICA, 34 °C

B – T PARA 40 °C EM t=15h E VOLTA PARA 34 °C EM t=21h

C = T PARA 40 °C EM t=18h E VOLTA PARA 34 °C EM t=24h

D = T PARA 40 °C EM t=24h E VOLTA PARA 34 °C EM t=30h

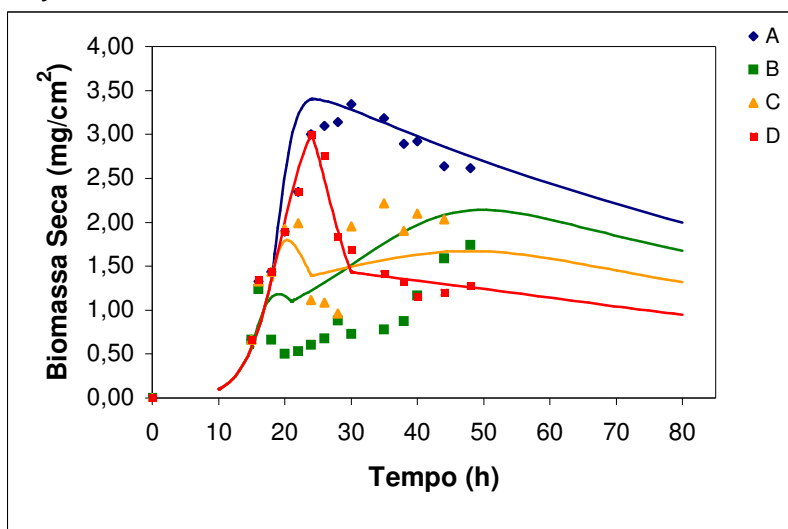
- = Ajuste do modelo

O modelo 1, com um único conjunto de valores para A_D , A_S , E_D , E_S , n , k_{dx} , μ e X_{\max} descreve razoavelmente bem, embora não perfeitamente, o efeito do aumento da temperatura para 45°C sobre o crescimento de *R. oryzae* em 4 diferentes regimes de incubação: um onde a temperatura foi mantida constante durante todo o ciclo de crescimento, os outros 3 sofreram um aumento de temperatura em tempos distintos de cultivo, um em 15 horas de cultivo, um em 18 horas de cultivo e um em 24 horas de cultivo (Figura 5.16). O modelo 1 também descreveu razoavelmente, para este conjunto de dados, a recuperação da biomassa quando a temperatura retornou para aquela ideal de 34°C.

Para este mesmo conjunto de parâmetros, o ajuste deste modelo aos dados experimentais provenientes de incubações onde a temperatura foi elevada para 40°C não foi tão bom (Figura 5.17), principalmente os ajustes aos dados experimentais provenientes dos cultivos representados pelas linhas B e D, onde o aumento da temperatura para 40°C ocorreu em 15 e 24 horas de cultivo, respectivamente. Para o cultivo D, o modelo previu uma queda brusca na biomassa a partir do tempo em que aumento da temperatura para 40°C aconteceu, em 24 horas, o que não ocorreu experimentalmente. No caso do cultivo B, uma queda na biomassa foi notada 7 horas após o aumento da temperatura, sendo que para estes dados experimentais o modelo não conseguiu prever esta diminuição na biomassa.

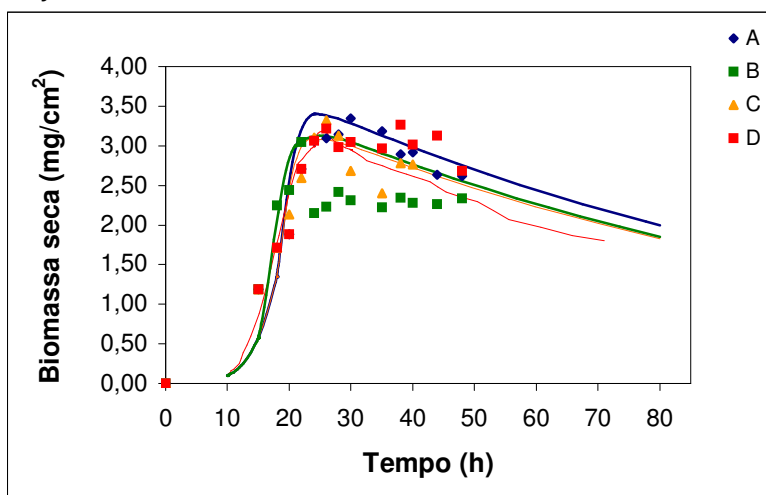
O Modelo 1 foi então modificado, dando origem ao Modelo 2, que proporcionou um conjunto de curvas melhor ajustadas aos dados experimentais na maior parte dos tratamentos, mas a capacidade de prever o perfil dos dados experimentais provenientes do cultivo B, tanto para o aumento de temperatura para 45°C (Figura 5.18) como para 40°C (Figura 5.19) diminuiu.

FIGURA 5.18 - AJUSTE DO MODELO 2 AOS DADOS EXPERIMENTAIS DO PERFIL DE CRESCIMENTO DE *R. oryzae*.



- A** – INCUBAÇÃO ISOTÉRMICA, 34 °C
- B** – T PARA 45 °C EM t=15h E VOLTA PARA 34 °C EM t=21h
- C** – T PARA 45 °C EM t=18h E VOLTA PARA 34 °C EM t=24h
- D** – T PARA 45 °C EM t=24h E VOLTA PARA 34 °C EM t=30h
- = Ajuste do modelo

FIGURA 5.19 - AJUSTE DO MODELO 2 AOS DADOS EXPERIMENTAIS DO PERFIL DE CRESCIMENTO DE *R. oryzae*.



- A** – INCUBAÇÃO ISOTÉRMICA, 34 °C
- B** – T PARA 40 °C EM t=15h E VOLTA PARA 34 °C EM t=21h
- C** = T PARA 40 °C EM t=18h E VOLTA PARA 34 °C EM t=24h
- D** = T PARA 40 °C EM t=24h E VOLTA PARA 34 °C EM t=30h
- = Ajuste do modelo

Quando os aumentos de temperatura foram para 45°C, o Modelo 2 descreveu melhor o atraso no efeito da alta temperatura, como pode-se ver nas linhas B e C da Figura 5.18, que ainda sobem acompanhando os dados experimentais depois do aumento da temperatura. Na linha D do Modelo 2, assim como os dados experimentais, os efeitos da alta temperatura se mostram instantes após a imposição do aumento. Porém, a linha B produzida por este modelo (a linha verde na Figura 5.18), não previu a queda de biomassa que ocorreu entre 16 e 22 horas de cultivo. Neste caso, a linha B fica paralela aos dados experimentais mas acima deles durante o período de 20 a 45 h. Outra diferença é que a linha C previu uma recuperação mais lenta que aquela acontecida experimentalmente.

As Figuras 5.17 e 5.19 ilustram os ajustes proporcionados pelos Modelos 1 e 2, respectivamente, aos dados experimentais não isotérmicos quando a temperatura foi elevada para 40°C. Para o cultivo não isotérmico representado pelos pontos em vermelho (cultivo D), os dois modelos previram uma queda na biomassa maior que aquela ocorrida. Esta discordância do modelo com os dados experimentais seria, possivelmente, devido ao fato de que quando o aumento de temperatura para 40°C foi imposto, em 24 horas de cultivo, o fungo já se encontrava na sua fase final de crescimento e não sofreu nenhum efeito significativo nesta temperatura. Esta falha na predição do modelo não é tão grave, uma vez que dentro de um biorreator de grande escala não aconteceria um aumento de temperatura nesta fase do crescimento, ou seja, nesta altura do ciclo de crescimento a temperatura já deveria estar retornando para 34°C. Interessantemente, a esta altura do ciclo de crescimento, quando o fungo foi sujeito a um aumento de temperatura para 45°C, a queda na biomassa foi prevista bem pelos modelos 1 e 2 (pontos e linhas vermelhas nas Figuras 5.16 e 5.18).

O Modelo 2 permite a alteração da constante da velocidade específica de crescimento, μ , quando ocorre o aumento de temperatura. Nas simulações, o μ aumentou com o aumento da temperatura. Isto proporcionou um bom ajuste da curva prevista aos dados experimentais quando a temperatura dos cultivos B e C foi elevada para 45°C (Figura 5.16), mostrando que velocidades de crescimento razoavelmente altas podem ser mantidas por algumas horas após o aumento de temperatura. Uma expressão cinética derivada da abordagem isotérmica preveria

uma redução na constante da velocidade específica de crescimento no instante em que o cultivo alcançasse a temperatura mais alta.

Na verdade, ambos os modelos 1 e 2 podem explicar o fato de haver crescimento em temperaturas mais altas do que aquelas nas quais o crescimento é notado em experimentos isotérmicos, isto é, quando o crescimento é iniciado em temperatura ótima, existe a possibilidade da velocidade de crescimento permanecer alta durante um certo tempo nestas temperaturas deletérias, desacelerando apenas quando o nível do componente essencial F dentro da célula diminuir. Este efeito é mais evidente no modelo 2, onde o valor de μ aumenta com o aumento da temperatura. Este fato também proporcionou uma compreensão das observações feitas por SAUCEDO-CASTAÑEDA *et al.* (1990) que, em seu modelo matemático de transferência de calor num biorreator de leite empacotado, expressou a constante da velocidade específica de crescimento como uma função da temperatura de acordo com os dados experimentais obtidos a partir de aproximações isotérmicas. Mas, as temperaturas do leite preditas pelo modelo foram significativamente mais baixas que os valores medidos e os autores foram capazes de prever as temperaturas medidas experimentalmente apenas quando a velocidade de crescimento foi assumida permanecer constante com o aumento de temperatura.

5.4.4 Importância da Abordagem Utilizada no Presente Trabalho

Apesar da capacidade dos modelos 1 e 2 de prever o crescimento em temperaturas mais altas que as ideais, não existem provas de que exista um componente essencial no qual a velocidade de crescimento celular e a síntese do próprio componente dependam dele próprio; desta maneira, sem a comprovação de mecanismos bioquímicos, este modelo deve ser considerado como sendo unicamente empírico. Mesmo assim, é interessante explorar o que já se conhece sobre as mudanças fisiológicas que acompanham o aumento de temperatura e seus efeitos na velocidade de crescimento.

Os efeitos deletérios de altas temperaturas podem ser devidos, em parte, à desnaturação dos ribossomos e enzimas, como também devido a alterações da fluidez das membranas (McMEEKIN *et al.*, 2002). Os ribossomos são bons

candidatos ao componente essencial F uma vez que são responsáveis, em parte, pela própria síntese e pela produção de material celular. Um dos poucos estudos feitos sobre o efeito da temperatura nos ribossomos de *Escherichia coli* mostrou que o aumento da temperatura causou um período transiente durante o qual o número de ribossomos funcionando e o número total de ribossomos diminuíram, sendo que os efeitos sobre o crescimento só se tornaram aparentes 2 horas após o aumento da temperatura (YUN, HONG & LIM, 1996).

A formulação do modelo elaborado nesta tese apresentou uma abordagem pouco usual, diferente daquelas que têm sido utilizadas nos modelos que descrevem o crescimento em processos de FES. Na maioria dos casos a velocidade específica de crescimento é expressa unicamente como uma função da temperatura atual (MITCHELL *et al*, 2000) como utilizada na abordagem matemática de SZEWCZYK & MYSZKA (1994), GELMI, PEREZ-CORREA & AGOSIN (2002), van de LAGEMAAT & PYLE (2004) e HAMIDI-ESFAHANI, SHOJAOSADATI & RINZEMA (2004). No modelo 2 apresentado neste trabalho, a constante da velocidade específica de crescimento aumenta com a temperatura, sendo que o efeito da temperatura é determinar a capacidade do fungo em crescer na sua velocidade específica de crescimento intrínseca (μ), que por sua vez depende do tratamento tempo-temperatura a que o fungo foi exposto previamente. O efeito disto está em atrasar as respostas às mudanças de temperatura: quando a temperatura aumenta, leva-se um tempo para que o componente F se desnature; do mesmo jeito, quando a temperatura cai para valores permissivos, leva-se um tempo para que sejam restabelecidos os níveis normais do componente F.

Desta maneira pode-se perguntar: É a constante da velocidade específica de crescimento, μ , uma função da temperatura atual? De acordo com a Equação de Arrhenius, a velocidade das reações químicas aumenta com a temperatura. Esperaria-se, então, que a velocidade específica de crescimento máxima que um organismo é capaz de apresentar, aumentasse com o aumento da temperatura. Este é, provavelmente, o efeito dominante que ocorre em temperaturas abaixo da temperatura ótima de crescimento. Contudo, o crescimento não é uma simples reação química, pois requer a coordenação de muitas reações químicas, em um sistema contendo mecanismos de controle, tais como o de choque térmico, que responde diretamente ao aumento de temperatura. Estes processos metabólicos são

complexos o suficiente para fazer com que qualquer modelo matemático que tente descrevê-los mecanisticamente seja complexo demais para ser útil (MITCHELL *et al.*, 2004). O modelo proposto aqui objetiva capturar estes efeitos enquanto mantém sua simplicidade.

5.4.5 Conclusões Do Modelo

Um modelo macroscópico baseado no crescimento de *R. oryzae* cultivado sobre placas em sistema *overculture* foi desenvolvido. Os parâmetros foram estimados empiricamente e o modelo descreve, com certas limitações, o efeito do aumento da temperatura sobre o crescimento do fungo, ou seja, o modelo cinético é capaz de prever, razoavelmente, o comportamento do fungo frente às mudanças que ocorrem na temperatura sem ser complexo demais. Ele descreve somente a produção de biomassa, isto é, não leva em consideração fenômenos tais como a difusão de nutrientes ou mesmo de oxigênio, o que tornaria sua expressão matemática complexa demais para ser incorporada em um modelo de biorreator.

O modelo não apenas se ajusta melhor ao perfil de crescimento que modelos baseados na abordagem isotérmica, como também proporciona um entendimento sobre o crescimento celular observado em cultivos onde a temperatura alcança valores mais altos que a temperatura ótima de cultivo, isto é, o modelo destaca que os efeitos da temperatura sobre o crescimento são complexos e são de uma complexidade que anteriormente não foi explicitamente reconhecida pelos modelos de abordagem isotérmica, que tratam o efeito da temperatura sobre o crescimento como se fosse um fenômeno muito simples.

Uma desvantagem do fato do modelo ser empírico é que, mesmo para *R. oryzae* ATCC 34612, ou seja, o mesmo microrganismo, é muito provável que os parâmetros mudem dependendo do meio de cultivo utilizado, requerendo um novo levantamento de dados experimentais para a determinação dos parâmetros do modelo cada vez que o meio de cultivo for mudado, ou toda vez que for alterada qualquer outra condição ambiental.

6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta tese foram determinados os efeitos dos aumentos de temperatura sobre o crescimento e a produção de glucoamilase de *Rhizopus oryzae* e estabelecido um modelo empírico para descrever a cinética de crescimento frente a estes aumentos.

Os efeitos do aumento da temperatura para 45°C mostraram-se rapidamente sobre o crescimento do fungo, em no máximo até 4 horas após o aumento. Os efeitos do aumento da temperatura para 40°C mostraram-se mais tardiamente, em até 8 horas após o aumento da temperatura.

Este estudo mostrou que durante condições de cultivo não isotérmicas, o fungo *R. oryzae* apresentou uma capacidade de resistir a uma temperatura de 45°C. Esta temperatura de 45°C é alta o suficiente para impedir a germinação e o conseqüente crescimento de *R. oryzae* quando cultivado em condições isotérmicas (item 5.1.3). Entretanto, este estudo não descreveu os mecanismos fisiológicos pelos quais *R. oryzae* resiste às mudanças na temperatura.

A equação Logística não pode ser utilizada como uma expressão empírica geral para descrever a cinética de crescimento em FES. O modelo empírico desenvolvido nesta tese pode descrever o comportamento cinético de *R. oryzae* cultivado em *overculture*, isto é, pode descrever a queda da biomassa que surge nos períodos tardios da fermentação.

O modelo desenvolvido nesta tese descreve os efeitos das mudanças na temperatura. Este modelo postula que o crescimento é controlado pelo nível de um componente intracelular F , que sofre desnaturação térmica. Entretanto, mais trabalhos são necessários, pois a dependência dos parâmetros do modelo das mudanças na temperatura não foi completamente elucidada. Mais trabalhos precisam ser feitos também com o objetivo de compreender se μ permanece ou não constante durante as mudanças na temperatura.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDOO, K.E.; HENDRY, R.; WOOD, B.J. Estimation of Fungal Growth in a Solid State Fermentation System. **Appl Microbiology and Biotechnology**: **12**, 6-9, 1981.

AIKAT, K., BHATTACHARYYA, B.C. Protease Extraction in Solid State Fermentation of Wheat Bran by a Local Strain of *Rhizopus oryzae* and Growth Studies by the Soft Gel Technique. **Process Biochemistry**: **35**, 907-914, 2000.

ASHLEY, V.M., MITCHELL, D.A. & HOWES, T. Evaluating strategies for overcoming overheating problems during solid state fermentation in packed bed bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**: **3**(2), 141-150, 1999.

BANDELIER, S., RENAUD, R. AND DURAND, A. Production of gibberellic acid by fed-batch solid state fermentation in an aseptic pilot-scale reactor. **Process Biochemistry**: **32**, 141-145, 1997.

BARAJAS- ACEVES, M.; HASSAN, M.; TINOCO, R.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Effect of Pollutants on the Ergosterol Content as Indicator of Fungal Biomass. **Journal of Microbiological Methods**: **50**, 227-236, 2002.

BARANYI, J., ROBINSON, T.P., KALOTI, A., MACKEY, B.M. Predicting Growth of *Brochothrix thermosphacta* at Changing Temperature. **International Journal of Food Microbiology**: **27**, 61-75, 1995.

BARANYI, J.; ROBERTS, T.A. Dynamic Approach to Predicting Bacterial Growth in Food. **International Journal of Food Microbiology**: **23**, 277-294, 1994.

BOVILL, R., BEW, J., COOK, N., D'AGOSTINO, M., WILKINSON, N., BARANYI, J. Predictions of Growth for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella*

During Fluctuation Temperature. **International Journal of Food Microbiology: 59**, 157-165, 2000.

BRAMORSKI, A. **Caracterização do Crescimento e Produção de Metabólitos Voláteis por Fungos Filamentosos Cultivados sobre Substratos Agroindustriais**. Curso de Pós-Graduação em Tecnologia Química. Dissertação de Mestrado. UFPR, Curitiba, 1997.

BRAMORSKI, A., CHRISTEN, P., RAMIREZ, M., SOCCOL, C.R., REVAH, S. Production of Volatile Compounds by the Edible Fungus *Rhizopus oryzae* During Solid State Cultivation on Tropical Agro-Industrial Substrates. **Biotechnology Letters** , **20** (4), 359-362, 1998 a.

BRAMORSKI, A.; SOCCOL, C.R.; CHRISTEN, P.; REVAH, S. Fruity Aroma Production by *Ceratocystis fimbriata* in a Solid Cultures from Agro-Industrial Wastes. **Revista de Microbiologia**, **28**: 208-212, 1998 b.

BRAND, D., PANDEY, A., ROUSSOS, S., SOCCOL, C.R. Biological Detoxification of Coffee Husk by Filamentous Fungi Using a Solid State Fermentation System. **Enzyme and Microbial Technology: 27**, 127-133, 2000.

CANNEL, E.; MOO-YOUNG, M. Solid-State Fermentation System. **Process Biochemistry**, **6**: 2-7, 1980.

CARRIZALEZ,V., RODRIGUEZ, H., SARDIÑA, I. Determination of the Growth Of Molds on Semi-Solid Cultures. **Biotechnology and Bioengineering:23**, 321-333, 1981.

CASTILHO, L.R.; MEDRONHO, R.A.; ALVES, T.L.M. Production and Extraction of Pectinases Obtained by Solid State Fermentation of Agroindustrial Residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology: 71**, 45-50, 2000.

CAUSTON, H.C.; REN, B.; KOH, S.S.; HARBISON, C.T.; KANIN, E.; JENNINGS, E.G.; LEE, T.I.; TRUE, H.L.; LANDER, E.R.; YOUNG, R.A. Remodeling of Yeast Genome Expression in Response to Environmental Changes. **Molecular Biology of the Cell**: **12**, 323-337, 2001.

CORDOVA-LOPEZ, J., GUTIERREZ-ROJAS, M., HUERTA, S., SAUCEDO-CASTANEDA, G., FAVELA-TORRES, E. Biomass estimation of *Aspergillus niger* Growing on Treal and Model Supports in Solid State Fermentation. **Biotechnology Techniques**: **10**,(1), 1-6, 1996.

CRUZ-CÓRDOVA, T., ROLDÁN-CARRILLO, T.G., DÍAZ-CERVANTES, D., ORTEGA-LÓPEZ, J., SAUCEDO-CASTANEDA, G., TOMASINI-CAMPOCOSIO, A., RODRIGUEZ-VÁSQUEZ, R. CO₂ Evolution and Ligninolytic and Proteolytic Activities of *Phanerochaete chrysosporium* Grown in Solid State Fermentation. **Resources, Conservation and Recycling**: **27**, 3-7, 1999.

DALSENTER, F.D.H. **Contribuição ao Estudo da proposta ZERI para um Resíduo Agroindustrial Utilizando Processo Biotecnológico**. Dissertação de Mestrado, FURB, Blumenau, SC, 2000.

DESGRANGES, C., VERGOLGNAN, C., GEORGES, M., DURAND, A. Biomass Estimation in Solid State Fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**: **35**, 200-205, 1991.

DOMINGUÉZ, M.; MEJÍA, A.; BARRIOS-GONZÁLEZ, J. Respiration Studies on Penicillin Solid-State Fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**: **89**(5): 409-413, 2000.

DURAND, A.; CHEREAU, D. A New Pilot Reactor for Solid-State Fermentation: Application to the Protein Enrichment of Sugar Beet Pulp. **Biotechnology and Bioengineering**: **31**, 476-486, 1988.

FEOFILOVA, E.P. Biochemical Adaptation of Mycelial Fungi to Temperature Stress. **Microbiology: 63** (5), 757-776, 1994.

FEOFILOVA, E.P.; TERESHINA, V.M.; MEMORSKAYA, A.S.; KHOKHLOVA, N.S. Different Mechanisms of the Biochemical Adaptation of Mycelial Fungi to Temperature Stress: Changes in the Lipid Composition. **Microbiology: 69** (5), 509-515, 2000.

GELMI C., PÉREZ-CORREA, R., AGOSIN, E. Modelling *Gibberella fujikuroi* Growth and GA3 Production in Solid-State Fermentation. **Process Biochemistry: 37**, 1033-1040, 2002.

GELMI, C.; PÉREZ-CORREA, R.; GONZÁLEZ, M.; AGOSIN, E. Solid Substrate Cultivation of *Gibberella fujikuroi* on an Inert Support. **Process Biochemistry: 35**, 1227-1233, 2000.

GHILDYAL, N.P.; GOWTHAMAN, M.K.; RAGHAVA RAO, K.S.M.S.; KARANTH, N.G. Interaction of Transport Resistences with Biochemical Reaction in Packed-Bed Solid-State Fermentors: Effect of Temperature Gradients. **Enzyme and Microbial Technology: 16**, 253-257, 1994.

GHILDYAL, N.P.; RAMAKRISHNA, M.; LONSANE, B.K.; KARANTH, N.G.; KRISHNAIAH, M.M. Temperature Variations and Amyloglucosidase Levels at Different Bed Depths in a Solid State Fermentation Systems. **Chemical Engineering Journal: 51**, 17-23, 1993.

HAMIDI-ESFAHANI,Z.; SHOJAOSADATI, S.A.; RINZEMA, A. Modelling of Simultaneous Effect of Moisture and Temperature on *A. Niger* Growth in Solid-State Fermentation. **Biochemical Engineering Journal: 21**, 265-272, 2004.

HAN, B.Z.; NOUT, R.M.J. Effects of Temperature, Water Activity and Gas Atmosphere on Mycelial Growth of Tempe Fungi *Rhizopus microsporus* var.

microsporus and *R. microsporus* var. *oligosporus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**: **16**, 853-858, 2000.

HARDIN, M.T., HOWES, T. & MITCHELL, D.A. Residence time distributions of gas flowing through rotating drum bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**: **74**, 145-153, 2001.

HESELTIME, C. W. Solid State Fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**: **14**, 517-532, 1972.

HESELTIME, C.W. Solid State Fermentation – Part 1. **Process Biochemistry**, **July/August**: 24-27, 1977.

HESELTIME, C.W.; WANG, H.L. Traditional Fermented Foods. **Biotechnology and Bioengineering**: **9**, 275-288, 1967.

HIMMELBLAU, D.M. **Basic Principles and Calculations in Chemical Engineering**. 5th edition. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1982.

IKASARI, L. & MITCHELL, D.A. Mimicking gas and temperature changes during enzyme production by *Rhizopus oligosporus* in solid-state fermentation. **Biotechnology Letters**: **20**, 349-353, 1998.

IKASARI, L. **Physiological Behaviour of *Rhizopus oligosporus* in Solid State Fermentation**. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia Química, Universidade de Queensland, Queensland, Austrália, 1997.

IKASARI, L., MITCHELL, D.A. Two-Phase Model of the Kinetics of Growth of *Rhizopus oligosporus* in Membrane Culture. **Biotechnology and Bioengineering**: **68**(6), 619-627, 2000.

IKASARI, L.; MITCHELL, D.A.; STUART, D.M. Response of *Rhizopus*

oligosporus to Temporal Temperature profiles in a Model Solid-State Fermentation System. **Biotechnology and Bioengineering**, **64** (6), 722-728, 1999.

JECU, L. Solid State Fermentation of Agricultural Wastes for Endoglucanase Production. **Industrial Crops and Products**: **11**, 1-5, 2000.

KUMAR, P.K.R. & LONSANE, B.K. Batch and Fed-Batch Solid-State Fermentations: Kinetics of Cell Growth, Hydrolytic Enzymes Production, and Gibberellic Acid Production. **Process Biochemistry**: **abril**: 43-47, 1983.

LEKHA, P.K., LONSANE, B.K. Biomass Estimation in Solid State Fermentation. In.: PANDEY, A. **Solid State Fermentation**. Nova Deli, India: Wiley Eastern Limited. p. 38-43, 1994.

LONSANE, B.K., GHILDYAL, N.P., BUDIATMAN, S., RAMAKRISHNA, S.V. Engineering Aspects of Solid State Fermentation. **Enzyme Microbial Technology**: **7**, 258-265, 1985.

LONSANE, B.K.; SAUCEDO-CASTANEDA, G.; RAIMBAULT, M.; ROUSSOUS, S.; VINIEGRA-GONZALES, G.; GHILDYAL, N.P.; RAMAKRISHMA, M.; KRISHNAIAH, M.M. Scale-up Strategies for Solid State fermentation Systems: a Review. **Process Biochemistry**, **26**: 1-15, 1991.

LU, W.; LI, D.; WU, Y. Influence of Water Activity and Temperature on Xylanase Biosynthesis in a Pilot-Scale Solid-State Fermentation by *Aspergillus sulphureus*. **Enzyme and Microbial Technology**, **32**: 305-311, 2003.

MAIORANO, A.E.; BONOMI, A.; SCHMIDELL, W.; OGAKI, Y. Determinação do Crescimento Celular em Fermentações em Estado Sólido. **Publicação do IPT**, 1992.

MAIORANO, A.E. **Produção de Pectinases por Fermentação em Estado Sólido**. Tese de Doutorado, Escola Politécnica – USP, São Paulo, 1990.

MARSH, A.J., STUART, D.M., MITCHELL, D.A., HOWES, T. Characterizing mixing in a rotating drum bioreactor for solid-state fermentation. **Biotechnology Letters**: **22**(6), 473-477, 2000.

McMEEKIN, T.A.; OLLEY, J.; RATKOWSKY, D.A.; ROSS, T. Predictive Microbiology: Towards the Interface and Beyond. **Internacional Journal of Food Microbiology**: **73**, 395-407, 2002.

MITCHELL, D.A. & VON MEIEN, O.F. Mathematical modeling as a tool to investigate the design and operation of the Zymotis packed-bed bioreactor for solid-state fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**: **68**(2), 127-135, 2000.

MITCHELL, D.A. **Development of a model system and a mathematical model for solid-state fermentation**. PhD Thesis, University of Queensland, Austrália, 1989.

MITCHELL, D.A., BEROVIC, M. & KRIEGER, N. Biochemical Engineering Aspects of SSF Bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**: **68**, 61-138, 2000.

MITCHELL, D.A., DOELLE, H.W. & GREENFIELD, P.F. Suppression of penetrative hyphae of *Rhizopus oligosporus* by membrane filters in a model solid-state fermentation system. **Biotechnology Techniques**: **3**, 45-50, 1989.

MITCHELL, D.A., GUMBIRA-SAID, E., GREENFIELD, P.F. AND DOELLE, H.W. Protein Measurement in Solid State Fermentation. **Biotechnology Techniques**: **5**, 437-442, 1991.

MITCHELL, D.A., LONSANE, B.K. Definition, Characteristics and Potencial. In: ed: DOELLE, H.W., MITCHELL, D.A., ROLZ, C.E. **Solid Substrate Cultivation**. Elsevier Applied Science, London, p. 1-16, 1992.

MITCHELL, D.A., PANDEY, A., SANGSURASAK P. & KRIEGER, N. Scale-Up Strategies for Packed-bed Bioreactors for Solid-State Fermentation. **Process Biochemistry**: **35**(1-2), 167-178, 1999.

MITCHELL, D.A.; von MEIEN, O.F.; KRIEGER, N. Recent Developments in Modelling of Solid-State Fermentation: Heat and Mass Transfer in Biorreactors. **Biochemical Engineering Journal**: **13**, 137-147, 2003.

MITCHELL, D.A.; von MEIEN, O.F.; KRIEGER, N.; DALSENTER, F.D.H. A Review of Recent Developments in Modeling of Microbial Growth Kinetics and Intraparticle Phenomena in Solid-State Fermentation. **Biochemical Engineering Journal**: **17**, 15-26, 2004.

MONTIEL-GONZALEZ, A. M.; VINIEGRA-GONZALEZ, G.; FERNÁNDEZ, F.J.; LOERA, O. Effect of Water Activity on Invertase Production in Solid State Fermentation by Improved Diploid Strains of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry, In Press**2003.

MOO-YOUNG, M.; MOREIRA, A.R.; TENDERDY, R.P. Principles of Solid-Substrate Fermentation. In: SMITH, D.E.; BERRY, D.R.; KRISTIANSEN, B. (Eds). **The Filamentous Fungi**. v 4, p.117, 1983.

MUDGETT, R.E. Solid State Fermentation. In: ed. DEMAIN, A.L., SOLOMON, N.A. **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**, American Society for Microbiology, Washington, p. 66-83, 1986.

NAGEL, F.J.; VAN AS, H.; TRAMPER, R.; RINZEMA, A. Water and Glucose Gradients in the Substrate Measured with NMR Imaging During Solid-State

Fermentation with *Aspergillus oryzae*. **Biotechnology and Bioengineering**: **79**, 653-663, 2002.

NAGEL, F.J.I.; TRAMPER, J.; BAKKER, M.S.N.; RINZEMA, A. Temperature Control in a Continuously Mixed Bioreactor for Solid-State Fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**: **72** (2), 219-230, 2001.

NANDAKUMAR, M.P.; THAKUR, M.S.; RAGHAVARAO, K.S.M.S.; GHILDYAL, N.P. Studies on Catabolite Repression in Solid State Fermentation for Biosynthesis of Fungal Amylases. **Letters in Applied Microbiology**, **29**:380-384, 1999.

NARAHARA, H.; KOYAMA, Y.; YOSHIDA, T.; ATTHASAMPUNNA, P.; TAGUCHI, H. Control of Water Content in a Solid-State Culture of *Aspergillus oryzae*. **Journal Fermentation Technology**: **62**(5), 453-459, 1984.

NARAHARA, H.; KOYAMA, Y.; YOSHIDA, T.; PICHANGKURA, S.; UEDA, R.; TAGUCHI, H. Growth and Enzyme Production in a Solid-State Culture of *Aspergillus oryzae*. **Journal Fermentation Technology**: **60**(4), 311-319, 1982.

NIGAM, P.; SINGH, D. Solid-State Substrate Fermentation System and their Applications in Biotechnology. **Journal Basic Microbiology**: **34** (6), 405-423, 1994.

NOPHARATANA, M., HOWES, T. & MITCHELL, D.A. Modelling fungal growth on surfaces. **Biotechnology Techniques**: **12**, 313-318, 1998.

NOPHARATANA, M., MITCHELL, D.A., HOWES, T. Use of Confocal Microscopy to Follow the Development of Penetrative Hyphae During Growth of *Rhizopus oligosporus* in an Artificial Solid-State Fermentation System. **Biotechnology and Bioengineering**: **81**(4), 438-447, 2003.

NWE, N.; CHANDRKRACHANG, S.; STEVENS, W.F.; MAW, T.; TAN, T.K.; KHOR, E.; WONG, S.M. Production of Fungal Chitosan by Solid State and Submerged Fermentation. **Carbohydrate Polymers: in press, 2001.**

OOIJKAAS, L.P., TRAMPER, J., BUITELAAR, R.M. Biomass Estimation of *Coniothyrium minitans* in Solid-State Fermentation. **Enzyme and Microbial Technology: 22**, 480-486, 1998.

OOSTRA, J.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A.; Model-based bioreactor selection for large-scale solid-state cultivation of *Coniothyrium minitans* spores on oats. **Enzyme and Microbial Technology: 27**, 652-663, 2000.

ORIOLE, E.; SCHETTINO, B.; VINIEGRA-GONZALEZ, G.; RAIMBAULT, M. Solid-State Culture of *Aspergillus niger* on Support. **Journal of Fermentation Technology: 66(1)**, 57-62, 1988.

PALMA, M.B. **Produção de Xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em Cultivo em Estado Sólido.** Tese de Doutorado, UFSC, Florianópolis, SC, 2003.

PALMA, M.B.; PINTO, A.L.; GOMBERT, A.K.; SEITZ, K.H.; KIVATINITIZ, S.C.; CASTILHO, L.R.; FREIRE, D.M.G. Lipase Production by *Penicillium restrictum* Using Solid Waste of Industrial Babassu Oil Production as Substrate. **Applied Biochemistry and Biotechnology: 84-86**, 1137-1145, 2000.

PANDEY, A. Solid-State Fermentation. **Biochemical Engineering Journal: 13**, 81-84, 2003.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P. Solid State Fermentation for the Production of Industrial Enzymes. **Current Science: 77**, 149-152, 1999.

PRIOR, B.A., PREEZ, J.C.D., REIN, P.W. Environmental Parameters. In: ed: DOELLE, H.W., MITCHELL, D.A., ROLZ, C.E. **Solid Substrate Cultivation**. Elsevier Applied Science, London. p. 65-85, 1992.

RAGHAVA RAO, K.S.M.S.; GOWTHAMAN, M.K.; GHILDYAL, N.P.; KARANTH, N.G. A Mathematical Model for Solid-State Fermentation in Tray Bioreactors. **Bioprocess Engineering**: **8**, 255-262, 1993.

RAJAGOPALAN, S.; MODAK, J.M. Heat and Mass Transfer Simulation Studies for solid-State Fermentation Process. **Chemical Engineering Science**: **49**(13), 2187-2193, 1994.

RAMACHANDRAN, S.; PATEL, A.K.; NAMPOOTHIRI, K.M.; FRANCIS, F.; NAGY, V.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Coconut Oil Cake – A Potencial Raw Material for the production of α -amilase. **Bioresource Technology**: **93**, 169-174, 2004.

RAMAKRISHNA, N.; LACEY, J.; SMITH, J.E. Effects of Water Activity and Temperature on the Growth of Fungi Interacting on Barley Grain. **Mycology**: **97**, 1393-1402, 1993.

RAMANA-MURTHY, M.V.; KARANTH, N.G.; RAO, K.S.M.S.R. Biochemical Engineering Aspects of Solid-State Fermentation. In: **Advances in Applied Microbiology**: **38**, 99-147, 1993.

RATHBUM, B.L.; SCHULER, M.L. Heat and Mass Transfer Effects in Static Solid-Substrate Fermentations: Design of Fermentation Chambers. **Biotechnology and Bioengineering** : **25**, 929-938, 1983.

RIDE, J.P.; DRYSDALE, R.B. A Rapid Method for the Chemical Estimation of Filamentous Fungi in Plant Tissue. **Physiology, Plant Pathology**: **2**, 7-15, 1972.

ROCHE, N.; DURAND, A. Kinetics of *Thermoascus auranticus* Solid-State Fermentation on Sugar-Beet Pulp – Polysaccharide Alteration and Production of related Enzymatic Activities. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **45**: 584-588, 1996.

SANGSURASAK, P. & MITCHELL, D.A. Incorporation of death kinetics into a 2-D dynamic heat transfer model for solid state fermentation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**: **64**, 253-260, 1995.

SANGSURASAK, P.; NOPHARATANA, M.; MITCHELL, D.A. Mathematical Modeling of the Growth of Filamentous Fungi in Solid State Fermentation. **Journal of Scientific of the Growth of Filamentous Fungi in Solid State Fermentation**: **55**, 333-342, 1996.

SARGANTANIS, J., KARIM, M.N., MURPHY, V.G., RYOO, D. & TENGEDY, R.P. Effect of operating conditions on solid substrate fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**: **42**, 149-158, 1993.

SATO, K., NAGATANI, M., NAKAMURA, K., SATO, S. Growth Estimation of *Candida lipolytica* from Oxygen Uptake in a Solid-State Culture with Forced Aeration. **Journal Fermentation Technology**: **61**(6), 623-629, 1983.

SATO, K., TODA, K. Oxygen Uptake rate of Immobilized Growing *Candida lipolytica*. **Journal Fermentation Technology**: **61**(3), 239-245, 1983.

SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; GUTIERREZ-ROJAS, M.; BACQUET, G.; RAIMBAULT, M.; VINIEGRA-GONZALEZ, G. Heat Transfer Simulation in Solid Substrate Fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**: **35**, 802-808, 1990.

SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; LONSANE, B.K.; NAVARRO, J.M.; ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M. Control of Carbon Dioxide in Exhaust Air as a Method for

Equal Biomass Yields at Different Bed Heights in a Column Fermentor. **Applied Microbiology and Biotechnology**: **37**, 580-582, 1992.

SMITS, J.P. RINZEMA, A., TRAMPER, J., SCHLÖSSER, E.E., KNOL, W. Accurate Determination of Process Variables in a Solid-State Fermentation Systems. **Process Biochemistry**: **31**(7), 669-678, 1996.

SMITS, J.P., RINZEMA, A. TRAMPER, J., VAN SONSBECK, H.M., HAGE, J.C., OKAYNAK, A., KNOL, W. The Influence of Temperature on Kinetics in Solid-State Fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**: **22**, 50-57, 1998.

SMITS, J.P., VAN SONSBECK, H.M., TRAMPER, J., KNOL, W., GEELHOED, W., PEETERS, M. & RINZEMA, A. Modelling fungal solid-state fermentation: the role of inactivation kinetics. **Bioprocess Engineering**: **20**, 391-404, 1999.

SOCOL, C.R., LEON, J.R., MARIN, B., ROUSSOS, S., RAIMBAULT, M. Growth Kinetics of *Rhizopus arrhizus* in Solid State Fermentation of Treated Cassava. **Biotechnology Techniques**: **7**(8), 563-568, 1993.

SOCOL, C.R.; MARIN, B.; RAIMBAULT, M.; LEBEAULT, J.M. Potencial of Solid State fermentation for Production of L(+) Lactic Acid by *Rhizopus oryzae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**: **41**, 286-290, 1994.

SOUZA, C.G.M.; ZILLY, A.; PERALTA, R.M. Production of Laccase as the Sole Phenoloxidase by a Brazilian Strain of *Pleurotus pulmonarius* in Solid State Fermentation. **Journal of Basic Microbiology**: **42** (2), 83-90, 2002.

SOUZA, M.C.O.; ROBERTO, I.C., MILAGRES, A.M.F. Solid-State Fermentation for Xylanase Production by *Thermoascus aurantiacus* Using Response Surface Methodology. **Applied Microbiology Biotechnology**: **52**, 768-772, 1999.

STERTZ, S.C., SOCCOL, C.R., RAIMBAULT, M., PANDEY, A., RODRIGUEZ-LEON, J.A. Growth Kinetics of *Rhizopus formosa* MUCL 28422 on Raw Cassava Flour in Solid State Fermentation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**: **74**, 580-586, 1999.

STUART, D.M.; MITCHELL, D.A.; JOHNS, M.R.; LITSTER, J.D. Solid-State Fermentation in Rotating Drum Bioreactors: Operating Variables Effects on Transport Phenomena. **Biotechnology and Bioengineering**: **63**, 395-407, 1999.

SZEWCZYK, K.W. & MYSZKA, L. The Effect of Temperature on the Growth of *A. niger* in Solid State Fermentation. **Bioprocess Engineering**: **30**, 123-126, 1994.

TAO, S., BEIHUI, L., DEMING, L., ZUOHU, L. Effect of Elevated Temperature on *Trichoderma viride* SL-1 in Solid State Fermentations. **Biotechnology Letters**: **19**(2), 171-174, 1997.

TOMASELLI-SCOTTI, C.; VERGOIGNAN, C.; FERON, G.; DURAND, A. Glucosamine Measurement as Indirect Method for Biomass Estimation of *Cunninghamella elegans* Grown in Solid State Cultivation Conditions. **Biochemical Engineering Journal**: **7**, 1-5, 2001.

TRINCI, A.P. Regulation of Hyphal Branching and Hyphal Orientation. In: **The Ecology and Physiology of the Fungal Mycelium**, p. 23-52. Edited by D.H. Jennings & ADM Rayner. Cambridge: Cambridge University Press.

van de LAGEMAAT, J. & PYLE, D.L. Modelling the Uptake and Growth Kinetics of *Penicillium glabrum* in a Tannic Acid-Containing Solid-State Fermentation for Tannase Production. **Process Biochemistry**, , 2004, **IN PRESS**.

VICCINI, G., MITCHELL, D.A., BOIT, S.D., GERN, J.C., da ROSA, A.S.,

COSTA, R.M., DALSETER, F.D.H., von MEIEN, O.F., KRIEGER, N. Analysis of Growth Kinetic Profiles in Solid-State Fermentation. **Food Technology and Biotechnology**: 39(4), 271-294, 2001.

WEBER, F.J.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A.; A Simplified Material and Energy Balance Approach for Process Development and Scale-up of *Coniothyrium minitans* Conidia production by Solid-State Cultivation in a Packed-Bed Reactor. **Biotechnology and Bioengineering**: 65, 447-458, 1999.

YUN, H.S.; HONG, J.; LIM, H.C. Regulation of Ribosome Synthesis in *Escherichia coli*: Effects of Temperature and Dilution Rate Changes. **Biotechnology and Bioengineering**: 52, 615-624, 1996.